

**Die Rolle von oxidativem Stress
bei der Entstehung von Deletionen
der mitochondrialen DNA.
Untersuchungen am SOD2-Knock-Out-Mausmodell**

Franziska Weber



2011

Wenn das menschliche Gehirn so einfach wäre, dass wir es verstehen könnten, wären wir so dumm, dass wir es trotzdem nicht verstehen würden.

Aus „Sofies Welt“ von Jostein Gaarder

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktorin: Prof. Dr. med. M. Dieterich

**Die Rolle von oxidativem Stress
bei der Entstehung von Deletionen
der mitochondrialen DNA.
Untersuchungen am SOD2-Knock-Out-Mausmodell**

*Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München*

vorgelegt von

Franziska Weber

aus

Würzburg

im Jahr

2011

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. A. Bender

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. T. Klopstock
PD Dr. med. S. Lichtenthaler**

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis:

1. THEORETISCHER HINTERGRUND	12
1.1. Einführung: Die mitochondriale Theorie des Alterns	12
1.2. Oxidativer Stress	17
1.2.1. Begriffsbestimmung oxidativer Stress	17
1.2.2. Ursache und Wirkung von oxidativem Stress	17
1.2.3. Neutralisation reaktiver Moleküle	19
1.3. Mitochondrien	23
1.3.1. Besonderheiten der mitochondrialen Genetik	23
1.3.2. Funktion der Mitochondrien	24
1.3.3. Pathologie der Mitochondrien	29
1.4. SOD2: Mitglied der Superoxiddismutase-Familie	33
1.4.2. Das SOD2-Knock-Out-Mausmodell	35
2. EIGENE FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	41
3. MATERIAL UND METHODEN	43
3.1. Tiere und Tierhaltung	43
3.1.1. Tiere	43
3.1.2. Ernährung	44
3.1.3. Tötungskriterien und standardisierte Tötung	45
3.2. Genotypisierung aus Tail-DNA mittels realtime PCR	45
3.2.1. Grundprinzipien der realtimePCR	45
3.2.2. Grundlagen der Genotypisierung mittels real-time PCR	47
3.2.3. Praktisches Vorgehen	47
3.3. Probengewinnung	49
3.3.1. Organentnahme und Konservierung	49
3.3.2. DNA-Extraktion aus Gewebehomogenat	50
3.3.3. Anfertigung histologischer Präparate aus Maushirn	50
3.4. Untersuchung des Probenmaterials	55
3.4.1. Quantitative Darstellung von Deletionen und Bestimmung der Kopienanzahl mittels realtime PCR	55
3.4.3. Qualitative Darstellung von Deletionen mittel nested long PCR	60
4. ERGEBNISSE	64
4.1. Genotypisierung mittels realtime PCR	64
4.2. Quantitative Darstellung von Deletionen und Bestimmung der Kopienanzahl mittels realtime PCR	64
4.2.1. Homogenatsuntersuchungen bei neugeborenen Tieren	65
4.2.2. Homogenatsuntersuchungen bei einjährigen Tieren	68
4.2.3. Zeitliche Dynamik der Deletionsbelastung	72
4.2.4. Zeitliche Dynamik der relativen Kopienanzahl	72
4.2.5. Relative Verteilung von Deletionen auf „minor“ bzw. „major arc“	73
4.3. Identifikation dopaminerger Neurone der Substantia Nigra	73
4.3.2. Ergebnisse Einzelzelluntersuchungen	73

4.4. Qualitative Darstellung von Deletionen mittels nested long PCR	74
5. DISKUSSION	76
5.1. Genotypisierung mittels realtime PCR	76
5.1.2. Ergebnis der Genotypisierung mittels realtime PCR	76
5.1.1. Methodik der Genotypisierung mittels realtime PCR	76
5.2. Homogenatsuntersuchungen	76
5.2.1. Deletionen in der mtDNA	76
5.2.3. Kopienanzahl der mtDNA	80
5.3. Einzelzelluntersuchungen	85
5.3.1. Tyrosinhydroxylase-Färbung	85
6. ZUSAMMENFASSUNG	87
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
9. DANKSAGUNGEN	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über zusätzliche mitochondriale ROS-Quellen	18
Tabelle 2: Übersicht des antioxidativen Abwehrsystems (<i>modifiziert nach Löffler G., 2006</i>)	19
Tabelle 3: Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Schaden im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (<i>modifiziert nach Halliwell B, 2006b</i>)	32
Tabelle 4: Zusammenschau der wichtigsten SOD2-Knock-Out-Modelle (<i>modifiziert nach Boelsterli UA, 2008</i>).....	36
Tabelle 5: Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen Neugeborener aus Herzgewebekomogenat	43
Tabelle 6: Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen aus Gehirngewebekomogenat	43
Tabelle 7: Einjährige Tiere für Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen aus diversen Gewebekomogenaten (Wildtypen).....	44
Tabelle 8: Einjährige Tiere für Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen aus diversen Gewebekomogenaten (Heterozygote)	44
Tabelle 9: Geräteeinstellungen für realtime PCR.....	48
Tabelle 10: Protokoll für realtime PCR (SOD2-Assay)	48
Tabelle 11: Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für realtime PCR (Genotypisierungsassay)	49
Tabelle 12: Reagenzien und Gerätschaften für DNA-Extraktion aus Gewebekomogenaten ..	50
Tabelle 13: Verbrauchsmaterial und Gerätschaften für die Anferetigung histologischer Präparate.....	51
Tabelle 14: Protokoll der TH-Färbung	53
Tabelle 15: Reagenzien für TH-Färbung.....	53
Tabelle 16: LMD-System.....	55
Tabelle 17: Reagenzien und Gerätschaften für DNA-Extraktion aus Einzelzellen	55
Tabelle 18: Protokoll der real-time PCR zur Deletionsbestimmung (ND1-Assay)	58
Tabelle 19: Protokoll der realtime PCR zur Deletionsbestimmung (COX3-Assay).....	58
Tabelle 21: Protokoll der realtime PCR zur Deletionsbestimmung (CytB-Assay).....	59
Tabelle 22: Primer und Probes für realtime PCR zur Deletionsbestimmung (ND1/COX3/CytB)	59
Tabelle 23: Reagenzien für realtime PCR zur Deletionsbestimmung.....	59
Tabelle 24: Protokoll für die erste Runde der long PCR.....	61
Tabelle 25: Protokoll für die zweite Runde der long PCR.....	62
Tabelle 26: Primer für long PCR.....	62
Tabelle 27: Geräteeinstellung für long PCR (erste und zweite Runde)	62
Tabelle 28: Protokoll zur Herstellung eines 1% Agarosegels mit kleinen Taschen für große KammerHerstellung eines 1% Agarosegels mit kleinen Taschen für große Kammer	63
Tabelle 29: Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die long PCR	63
Tabelle 30: Geräte für long die PCR	63
Tabelle 31: Verteilung der Genotypen	64
Tabelle 32: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von Herzhomogenat	66
Tabelle 33: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von Gehirnhomogenat ..	66
Tabelle 34: Relative Kopienanzahl bei Neugeborenen aus mtDNA von Herzhomogenat	66
Tabelle 35: Relative Kopienanzahl bei Neugeborenen aus mtDNA von Gehirnhomogenat ...	66
Tabelle 36: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Herzhomogenat.	68
Tabelle 37: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Muskelhomogenat	68
Tabelle 38: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Gehirnhomogenat	69
Tabelle 39: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Leberhomogenat	69

Tabelle 40: Relative Kopienanzahlsbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Herzhomogenat	70
Tabelle 41: Relative Kopienanzahlsbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Muskelhomogenat	70
Tabelle 42: Relative Kopienanzahlsbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Gehirnhomogenat	70
Tabelle 43: Relative Kopienanzahlsbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Leberhomogenat	70
Tabelle 44: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von SNNeuronen.....	74
Tabelle 45: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von SN-Neuronen	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bedeutung diverser Enzyme bei der Entstehung und Beseitigung potentiell schädlicher Moleküle (<i>modifiziert nach Löffler G., 2006</i>)	20
Abbildung 2: Bedeutung von Vitamin E (Tocopherol) und Vitamin C (Ascorbat) bei der Entstehung und Beseitigung potentiell schädlicher Molekül (<i>modifiziert nach Löffler G., 2006</i>).....	21
Abbildung 3: Signalkaskaden vermittelte Regulation der mitochondrialen Biogenese (<i>modifiziert nach Lee HC, 2006</i>).....	29
Abbildung 4: Prinzip der Fluoreszenzmessung während der realtime PCR (<i>Applied Biosystems</i>).....	46
Abbildung 5: Standardkurve für real-time PCR (<i>eigene Ergebnisse</i>).....	47
Abbildung 6: Teilungsschemata der Maushirne.....	49
Abbildung 7: Schemata zur Anfertigung von Gewebeschnitten aus Maushirn	51
Abbildung 8: Übersicht bzw. Ausschnitte eines gefärbten Maushirn-Koronarschnittes mit SN in unterschiedlichen Vergrößerungen (6x bis 40x) (<i>eigene Arbeiten</i>)	52
Abbildung 9: LMD-System: Leica LMD 7000 (<i>Leica Microsystems</i>)	54
Abbildung 10a,b,c: (a) angefärbte SN-Neurone (40x Vergrößerung), (b) mit Markierung für LMD (c) nach LMD (<i>eigene Arbeiten</i>)	54
Abbildung 11: Plattenbelegung für Deletionsuntersuchung und Kopienanzahlbestimmung mittels realtime PCR	57
Abbildung 12: Etablierte Standardkurve für real-time PCR zur Deletionsberechnungen (ND1/COX3/CytB-Methode) (<i>eigene Arbeiten</i>).....	58
Abbildung 13: Verteilung der Genotypen	64
Abbildung 14: Legende für verwendete Boxplots (<i>Wikipedia</i>).....	65
Abbildung 15: Deletionen bei neugeborenen Tieren aus mtDNA von Herz-bzw. Hirnhomogenat.....	65
Abbildung 16: Relative Kopienanzahl bei neugeborenen Tieren aus mtDNA von Herz- bzw. Hirnhomogenat.....	66
Abbildung 17: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Herzhomogenat von neugeborenen Tieren	67
Abbildung 18: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Hirnhomogenat von neugeborenen Tieren	67
Abbildung 19: Deletionen bei einjährigen Tieren aus mtDNA von Herz-, Hirn-, Muskel- und Leberhomogenat.....	68
Abbildung 20: Relative Kopienanzahl bei einjährigen Tieren aus mtDNA von Herz-, Hirn-, Muskel- und Leberhomogenat.....	69
Abbildung 21: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Herzhomogenat von einjährigen Tieren.....	70
Abbildung 22: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Muskelhomogenat von einjährigen Tieren.....	71
Abbildung 23: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Hirnhomogenat bei einjährigen Tieren.....	71
Abbildung 24: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Leberhomogenat bei einjährigen Tieren.....	71
Abbildung 25: Vergleich der Deletionen neugeborene vs. einjährige Tiere	72
Abbildung 26: Vergleich der relativen Kopienanzahl neugeborene vs. einjährige Tiere	72
Abbildung 27: Relative Verteilung der Deletionen.....	73
Abbildung 28: Deletionen in der mtDNA aus SN Neuronen von neugeborenen Tieren	73
Abbildung 29: Deletionen in der mtDNA aus SN Neuronen von einjährigen Tieren	74

Abbildung 30 (Bild A1 und A2): Ergebnisse der long PCR (DNA aus Herzhomogenat von älteren Tieren)	75
Abbildung 31 (Bild B1): Verdünnungsexperiment 1 zu Abb. 16 Bild A1 (Endprodukte verdünnt); (Bild B2): Verdünnungsexperiment 2 zu Abb. 16 Bild A1 (Produkte der 1. Runde stärker verdünnt)	75

Formelverzeichnis

Formel 1: Fentonreaktion	15
Formel 2: SOD-abhängige Dismutation.....	33
Formel 3: Berechnung der Effizienz für realtime PCR.....	46
Formel 4: Berechnung des Genotyps mittels realtime PCR Ergebnissen	47
Formel 5: Berechnung der mtDNA-Deletionen in Prozent (ND1/ND4-Methode).....	56
Formel 6: Normalisierung der Ct-Werte mittels Standard für Deletionsberechnung (ND1/COX3/CytB-Methode).....	56
Formel 7: Berechnung des maximalen Deletionsgrades in Prozent (ND1/COX3/CytB- Methode)	56
Formel 8: Normalisierung der Ct-Werte mittels Standard für Kopienanzahlberechnung.....	57
Formel 9: Berechnung der relativen mtDNA-Kopienanzahl	57

1. Theoretischer Hintergrund

1.1. Einführung: Die mitochondriale Theorie des Alterns

Oxidativer Stress, ein Risikofaktor für mitochondriale Deletionen? In der vorliegenden Arbeit soll ein spezieller Aspekt der sogenannten „Mitochondrialen Theorie des Alterns“ untersucht werden. Was verbirgt sich hinter dieser Theorie?

Sie beschreibt eine Beteiligung der Mitochondrien und im Besonderen auch der mitochondrialen DNA (mtDNA) am Alterungsprozess. Es handelt sich um eine der meist beachteten Alterungstheorien. In der Wissenschaft ist die Theorie auf großes Interesse gestoßen; allerdings auch im Sinne starker Kontroversen.

Begründer der Theorie ist Harman, der bereits 1956 den Grundstein legte (*Harmann D, 1956*). In seinen Publikationen mutmaßte er über einen Kausalzusammenhang zwischen Mechanismen des Alterns und einer Schädigung von Bestandteilen der Zelle durch freie Radikale (*Harmann D, 1956, 1972, 1973*). Später hat er den Begriff der „Freien Radikale Theorie des Alterns“ geprägt (*Harmann D, 1973*). Im Laufe der Jahre wurde die Theorie modifiziert und spezifiziert (*Harmann D, 1983; Linnane AW, 1989; Wei YH, 1992; Miquel J 1980,1991; Lin MT, 2006*).

Die „Mitochondriale Theorie des Alterns“ postuliert einen Teufelskreis, bestehend aus

- (1) der Akkumulation von somatischen mtDNA Mutationen in postmitotischem Gewebe
- (2) einer Beeinträchtigung der Atmungskettenfunktion
- (3) einer zunehmenden Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien und
- (4) einer weiteren Schädigung der mtDNA und anderer mitochondrialer Strukturen.

Dieser Theorie entsprechend führt die progrediente Akkumulation somatischer Mutationen in der mtDNA, bedingt durch oxidativen Stress während der Lebenszeit eines Individuums, zu einem Verfall der bioenergetischen Funktion der Mitochondrien. Demnach ist die Akkumulation von Deletionen ein wesentlicher Faktor des Alterungsprozesses. Mitochondrien spielen in diesem Prozess eine Schlüsselrolle: Zum einen sind sie bedingt durch ihre Funktion als Energieproduzenten Hauptquelle für intrazelluläre ROS, zum anderen sind sie auch Hauptziel der schädlichen ROS bedingt durch die Lokalisation der Atmungskette in unmittelbarer Nachbarschaft und auf Grund einer Reihe spezifischer Vulnerabilitätsfaktoren (*Alexeyev MF, 2004; Miquel J., 1980*). Wichtige Landmarke in der Entwicklung der Theorie war die Entdeckung einer mitochondrienspezifischen Isoform der Superoxiddismutase 2 (SOD2), die maßgeblich für die Elimination der Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) in der mitochondrialen Matrix verantwortlich ist (*Weisiger RA, 1973*). Die Letalität der homozygoten SOD2-Knock-Out-(KO)-Maus (*syn.: SOD2^{-/-}-Maus*) belegt eindrucksvoll die bedingungslose Notwendigkeit einer suffizienten antioxidativen Abwehr in den Mitochondrien (*Li Y, 1995*). Homozygote-KO-Mausmodelle der anderen beiden, nicht-mitochondrial lokalisierten, Isoformen der SOD sind dagegen gut mit dem Leben vereinbar (*Carlsson LM, 1995; Reaume AG, 1996*).

In den vergangenen paar Dekaden wurde die mitochondriale Theorie des Alterns über verschiedene Ansätze extensiv überprüft: Zum einen lieferten molekular- und zellbiologische Studien grundlegende unterstützende Hinweise (*Balaban RS, 2005*). Zum anderen zeigten Untersuchungen an alternden Menschen und Tieren eine gute Korrelation zwischen Alterung und erhöhter mitochondrialer ROS-Produktion sowie zwischen mitochondrialem Funktionsverfall und Akkumulation von mtDNA-Mutationen (*Perez-Campo R, 1998*). Zudem wurden

einige transgene und Knock-Out-Mausmodelle etabliert, die Einblicke in die „Mitochondriale Theorie des Alterns“ gewähren (Youngmok CJ, 2009).

Bereits 1992 konnte nachgewiesen werden, dass es in Gehirnhomogenat von Menschen mit zunehmendem Lebensalter zur Akkumulation der sogenannten „Common Deletion“ (Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷) kommt (Corral-Debrinski M, 1992). Nachdem die Deletionsbelastung der gesamten mtDNA jedoch maximal nur 10% betrug und damit 90% unbeschädigte mtDNA verblieb, erachtete man eine funktionelle Relevanz für unwahrscheinlich. Erst im Laufe der letzten Jahre konnte dank kontinuierlicher Verbesserung der Methodik die tatsächliche Gesamtdeletionsbelastung hinreichend analysiert werden. Statt der bloßen Untersuchung von Gewebehomogenat können nun mit Hilfe der Lasermikrodissektion (LMD) Untersuchungen auf Einzelzellebene gemacht werden (He L, 2002). Zudem bietet eine neu entwickelte, sehr sensitive, quantitative PCR-Methode die Möglichkeit der Quantifizierung nicht nur einer spezifischen Deletion, sondern die quantitative Erfassung fast sämtlicher Δ mtDNA (Krishnan KJ, 2007a).

Des Weiteren konnte in der letzten Dekade gut etabliert werden, dass Mitochondrien eine Schlüsselrolle in der Initiation, Exekution und Regulation der Apoptose (programmierter Zelltod) spielen (Lee HC, 2000a).

Trotzdem bleiben noch viele Fragen offen; im Besonderen steht der endgültige Beweis eines Kausalzusammenhangs zwischen oxidativem Stress und Alterungsprozessen aus (Andersen JK, 2004). Ist oxidativer Stress Verursacher des Schadens oder nur ein assoziiertes Phänomen? Mit enormem Engagement wird diese Frage in Fachkreisen diskutiert (Bonawitz ND, 2007; Krishnan KJ, 2007b; Hiona A, 2008). Sicherlich ist es relevant, Alterungsprozesse auf molekularer Ebene zu verstehen, um therapeutisch gezielt eingreifen zu können.

Trotzdem stellt die Forschung am physiologischen Alterungsprozess im Rahmen von oxidativem Stress und mitochondrialen Struktur- bzw. Funktionsstörungen wohl nur die Spitze des Eisbergs dar. Längst hat man erkannt, dass oxidativer Stress unter Mitbeteiligung der Mitochondrien bei diversen Leiden eine wichtige Rolle spielt. An Beispielen hierfür seien Krebs, Diabetes und neurodegenerative Erkrankungen genannt (Wallace DC, 1999). Hervorzuheben sind v.a. die neurodegenerativen Erkrankungen, die aus verschiedenen Gründen eine besondere Stellung einnehmen:

Wichtigster Risikofaktor für einige neurodegenerative Erkrankungen ist das Alter. Die Inzidenz von M. Parkinson (PD) beträgt bei 65-69 Jährigen 0,6%; bei 85-89 Jährigen beträgt die Inzidenz 2,6% (deRijk MC, 2000). Beim M. Alzheimer (AD) ist der Einfluss des Alters als Risikofaktor noch mächtiger: unter den über 65 Jährigen erkrankt immerhin jeder Zehnte; bei den über 85 Jährigen erkrankt jeder Zweite (Evans DA, 1989; Kukull A, 2002).

In einer immer älter werdenden Gesellschaft nehmen die Erkrankungen weiter an Bedeutung zu. Gleichzeitig implizieren die Fakten, dass es sich bei den genannten Erkrankungen möglicherweise „nur“ um eine spezielle Facette des Alterungsprozesses handelt. Jüngere Untersuchungen haben ergeben, dass es auf zellulärer Ebene zu ähnlichen Veränderungen kommt (Reeve AK, 2008a). Im Vergleich zum normalen Alterungsprozess sind die Veränderungen allerdings organ- bzw. zellspezifisch. Es liegt in der Natur der Sache, dass Neurodegeneration primär das Gehirn betrifft. Außerdem hat man festgestellt, dass bestimmte Areale des Hirns und damit bestimmte Zellpopulationen besonders betroffen sind. Es konnten gewebespezifische Deletionsmuster des mitochondrialen Genoms identifiziert werden (Meissner C, 2006). Besondere Erwähnung verdient an dieser Stelle auch eine Arbeit, die belegt dass die Konzentration des mitochondrialen Schutzzyms SOD2 je nach Hirnregion schwankt. Untersuchungen am SOD2^{-/-}-Mausmodell mit neurodegenerativem Phänotyp ergaben, dass die Areale besonders stark von den degenerativen Schäden betroffen waren, die „im Gesunden“, also bei homozygoten Wildtypen für SOD2 (SOD2^{+/+}), hohe SOD2-Levels aufweisen (Lynn S, 2005). Die Daten implizieren, dass unterschiedliche Faktoren die selektive neuronale Vulnerabilität modulieren.

Eine herausragende Stellung nimmt dabei die Pathophysiologie des PD ein: Ursächlich für PD ist der selektive Untergang dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNpc) (*Forno LS, 1981*). Die molekularen Mechanismen des Verlusts der speziellen Neuronenpopulation sind bis heute nicht genau verstanden. Umso bahnbrechender war die Erkenntnis, dass genau innerhalb dieser Population funktionsdefiziente Zellen mit hohen Mutationsraten in der mtDNA nachgewiesen werden konnten (*Bender A, 2006; Kraytsberg Y, 2006*).

Mit Hilfe der bereits erwähnten Innovation der Methodik konnte vor kurzem in humanem Post-Mortem-Gewebe gezeigt werden, dass die wahre Belastung an mitochondrialen Deletionen (Δ mtDNA) in Neuronen der SN deutlich höher ist, als bisher angenommen. Einzelne Neurone von Parkinson-Patienten wiesen im Mittel Deletionsgrade von 50% auf und selbst in Neuronen von Kontrollen konnten Deletionsgrade von bis zu 40% nachgewiesen werden. Zudem bestätigte sich, dass eine Deletionsbelastung ab ca. 70% funktionell relevant wird (*Sciacco M, 1994; Bender A, 2006; Kraytsberg Y, 2006*). Mit Hilfe enzymchemischer Färbungen im histologischen Präparat lassen sich v.a. Defekte der partiell mitochondrial kodierten Cytochrom-c Oxidase (COX) als Ausdruck einer funktionellen Beeinträchtigung der Atmungskette darstellen (*Müller-Höcker J, 1989*). Des Weiteren konnte bei der Kontrollgruppe in Konkordanz zur mitochondrialen Alterungshypothese ein linearer Zusammenhang zwischen steigender Deletionsbelastung und steigendem Lebensalter nachgewiesen werden (*Bender A, 2006*). Simultan dazu bestätigte eine andere Arbeitsgruppe mit einer differierenden Quantifizierungsmethode die Ergebnisse in SN-Neuronen (*Kraytsberg Y, 2006*).

Trägt man den hohen Deletionsgraden Rechnung, erscheint die Beteiligung der Δ mtDNA an der Pathophysiologie der Zelle wahrscheinlich. Offenbar kann die verbleibende mtDNA keine suffiziente Energieversorgung mehr gewährleisten.

Weiteres Indiz für eine entscheidende Rolle von Δ mtDNA im Alterungsprozess stellen jüngste Studien an sogenannten POLG-Mäusen dar. Bei den POLG-Mäusen handelt es sich um Knock-In-Tiere mit einem Defekt in der korrekturlesenden Funktion der mitochondrialen DNA-Polymerase γ (POLG), die für Reparaturen der mtDNA verantwortlich ist. Die Tiere weisen sowohl geno- wie auch phänotypische Veränderungen auf: Zum einen konnten multiple Δ mtDNA nachgewiesen werden, zum anderen fielen Zeichen des vorzeitigen Alterns sowie eine reduzierte Lebensspanne auf (*Trifunovic A, 2004*). In einer späteren Arbeit konnte an der mitochondrialen Mutator-Maus gezeigt werden, dass Δ mtDNA treibende Kräfte für vorzeitiges Altern der Mäuse sind (*Vermulst M, 2008*).

Deutlich wird der Zusammenhang von oxidativem Stress, Δ mtDNA und Lebensspanne auch am Katalase-überexprimierenden Mausmodell. Das Enzym Katalase ist Teil der antioxidativen Zellausstattung. Mäuse mit einem Plus dieses Schutzzyms weisen eine verlängerte Lebensspanne bei gleichzeitig reduzierter Δ mtDNA-Belastung auf (*Schriner SE, 2005*).

Über die detaillierten molekularen Mechanismen der Deletionsentstehung ist bisher wenig bekannt. In Einzelzelluntersuchungen konnten pro Neuron meist nur eine bestimmte, klonal expandierte Deletion nachgewiesen werden. Interessanterweise treten die Deletionen nicht stochastisch normalverteilt auf dem 16569Bp langen ringförmigen mtDNA-Molekül auf, sondern gehäuft an Prädilektionsstellen im sogenannten „major arc“. Einzelzelluntersuchungen belegen die erhöhte Vulnerabilität von Bereichen mit direkten Basenwiederholungen („direct repeats“) als potentielle Deletions-Bruchstellen („breakpoints“) (*Reeve AK, 2008b*).

Im Besonderen in postmitotischen Zellen scheint das DNA-Reparatursystem wesentliche in die Pathogenese der klonalen Expansion von Δ mtDNA involviert zu sein. Durch oxidativen Stress bedingter Schaden der nukleären DNA (nDNA) und der mtDNA wird in erster Linie durch das sogenannte „Base-Excision-Repair“-System (BER) repariert (*Fishel ML, 2007*). Das System besteht aus unterschiedlichen Komponenten, wie z. B. der 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1). Diese ist in Neuronen gealterter Mäuse vermindert, so dass es vermehrt

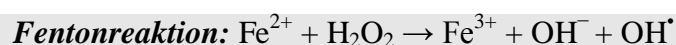
zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommt, die maßgeblich an der Entstehung von Δ mtDNA beteiligt sind (Rolseth V, 2008; Fukui H, 2009). Als Indiz für die protektive Funktion der OGG1 kann die Beobachtung gewertet werden, dass ausgerechnet im Kleinhirn die OGG1-Expression hoch ist. Diese Hirnregion weist selbst im Alter sehr niedrige Δ mtDNA-Belastungen auf (Meissner C, 2006).

Offenbar existieren spezifische Faktoren, die die unterschiedliche Vulnerabilität verschiedener Hirnregionen innerhalb eines Individuums bedingen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass bestimmte Zellpopulationen besonders anfällig für die Akkumulation von Δ mtDNA sind. In einer Studie wurden die Deletionsbelastungen verschiedener Hirnregionen von PD-, AD- und Kontrollpatienten miteinander verglichen. Unabhängig von der neurodegenerativen Grunderkrankung zeigte sich dabei ein charakteristisches Verteilungsmuster der Δ mtDNA. Die pigmentierten Neurone der SN wiesen dabei im Vergleich zu frontalem Cortex, Hippocampus und Putamen immer die höchsten Deletionswerte auf (Bender 2006, 2008). Nicht-neuronales Gewebe akkumulierte dabei ebenfalls deutlich weniger Δ mtDNA. Welche Faktoren könnten die erhöhte Vulnerabilität dopaminerger Neurone der SN bedingen? Tatsächlich weisen diese Neurone eine Reihe von Besonderheit auf:

- (1) Synthese des Neurotransmitters Dopamin (Spencer JP, 1998; Cohen G, 1999)
- (2) Neuromelanin als Metabolit (Fasano M, 2006)
- (3) Hohe Eisenkonzentrationen (Schenck JF, 2004; Oakley AE, 2007)
- (4) Missverhältnis von hoher oxidativer und metabolischer Kapazität bei geringen antioxidativen Schutzmechanismen (Halliwell B, 2006a)
- (5) Besondere Vulnerabilität für mitochondriale Dysfunktion und ROS-vermittelte Schädigung (Andreassen OA, 2002; Liang LP, 2004a; Bender A, 2006)

Sowohl Dopamin als auch Intermediärprodukte des Dopaminstoffwechsels (v.a. Dopaquinon) können durch enzymatische und nicht-enzymatische Oxidation die ROS-Produktion begünstigen (Spencer JP, 1998; Cohen G, 1999).

Eisen fördert über den Mechanismus der so genannten Fenton-Reaktion die Generierung von ROS (Fenton HJH, 1894; Oakley AE, 2007):



Formel 1: Fentonreaktion

Die Rolle von Neuromelanin wird kontrovers diskutiert: Einerseits wirkt es protektiv, in dem nicht nur Eisen sondern auch ausgesprochen reaktionsfreudige, toxische Substanzen, wie z.B. Dopaquinon oder das mitochondriale Toxin 1-Methyl-4-Phenylpyridin (MPP^+) bindet. Andererseits mehren sich die Hinweise, dass Neuromelanin bei Überschreitung seiner Eisenbindungskapazität selbst toxisch wirken kann (Fasano M, 2006). Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die belegen, dass in stark pigmentierten Neuronen die Δ mtDNA-Belastung deutlich höher ist, als in dopaminerger Neuronen mit wenig bzw. ohne Melanin.

Das Phänomen der Akkumulation von Δ mtDNA in SN-Neuronen bis hin zum Funktionsverlust wurde bereits ausführlich dargestellt (Bender A, 2006).

Interessanterweise konnte in Mäusen mit partieller Defizienz der SOD2 eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber den mitochondrialen Toxinen Malonat, 3-Nitropropionsäure (3-NP) und 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) nachgewiesen werden. Dies äußerte sich durch erhöhte Anfälligkeit für Dopamin-Depletion nach MPTP-Gabe und durch den Nachweis von signifikant ausgedehnteren striatalen Läsionen nach 3-NP- bzw. Malonat-Gabe im

Vergleich zu Mäusen mit voller SOD2-Aktivität. Zudem konnten erhöhte ROS-Konzentrationen nachgewiesen werden, die mutmaßlich an der MPTP-, 3-NP- bzw. Malonat-vermittelten Neurotoxizität beteiligt sind (*Andreassen OA, 2001*).

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Superoxid-Toxizität in SN-Neuronen nach MPTP-Gabe über das Eisen-Schwefel-(Fe-S)-haltige Enzym Aconitase vermittelt wird. Die Gabe von MPTP ist ein etabliertes Modell für experimentellen PD. Die Behandlung der Mäuse bewirkte eine Inaktivierung der mitochondrialen Aconitase, die Akkumulation von Eisen und Dopamin-Depletion. Diese Effekte waren in SOD2-überexprimierenden Mäusen abgeschwächt, wohingegen es bei Mäusen mit partieller SOD2-Defizienz zur Exazerbation kam (*Liang LP, 2004a*).

Die Daten belegen, dass subklinische Defekte eines antioxidativen Schutzzyms gepaart mit exogenen Toxinen in selektiver Neurodegeneration münden können.

Auf der anderen Seite kann auch mitochondriale Dysfunktion bedingt durch verminderte mtDNA-Expression zu einem PD-Phänotyp in Mäusen führen. Ursache der verminderten mtDNA-Expression ist ein selektiver Knock-Out für den Mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM) in den dopaminergen Neuronen der SN. Bei den Mäusen konnten selektiv in dieser Region Elektronentransportketten-(ETC)-Defekte in Kombination mit Zellverlusten nachgewiesen werden (*Ekstrand MI, 2007*). Offenbar ist eine ausreichende Zahl an suffizienten mtDNA-Kopien essentiell für die Funktion und Überlebensfähigkeit der dopaminergen SN-Neurone.

Über den Zusammenhang des Alterungsprozesses mit mtDNA-Schädigung wird seit vielen Jahren intensiv geforscht. Während eine Korrelation von Altern zu erhöhten ROS- und Δ mtDNA-Belastungen mittlerweile gut etabliert ist, steht der Kausalitätsnachweis nach wie vor aus (*Andersen JK, 2004*). Die Δ mtDNA treten ubiquitär bei verschiedenen Erkrankungen und in verschiedenen Zellarten auf, allerdings zeigen dopaminerge Neurone eine besondere Suszeptibilität für Schäden. Ursächlich könnte der Beobachtung die starke Exposition gegenüber ROS zu Grunde liegen (*Manfredi G, 2006*). Δ mtDNA können lange Zeit klinisch stumm bleiben. Wird jedoch ein gewisser Schwellenwert überschritten, manifestieren sich die Δ mtDNA als mitochondriale Funktionsstörung (*Bender A, 2006*). Mitochondriale Dysfunktion wird häufig mit Alterungsprozessen und Neurodegeneration assoziiert (*Baron M, 2007*).

In der vorliegenden Arbeit sollen Kausalität und zeitliche Dynamik von Δ mtDNA untersucht werden. Als Modell wurde hierfür das SOD2-KO-Mausmodell gewählt. Durch den Ausfall der kompartimentspezifischen SOD2 ist das Modell durch ein hohes Maß an endogenem oxidativen Stress selektiv in den Mitochondrien gekennzeichnet.

Im theoretischen Teil der Arbeit sollen zunächst, unter Berücksichtigung der aktuellen Forschung, die Grundlagen von oxidativem Stress, Mitochondrien und SOD2 vermittelt werden.

1.2. Oxidativer Stress

Oxidativer Stress spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen und des Alterns. Übermäßiger oxidativer Stress führt zu strukturellen und funktionellen Veränderungen der Zelle. Besonders davon betroffen sind die Mitochondrien und die mtDNA. Einerseits sind Mitochondrien hauptverantwortlich für die Produktion des oxidativen Stresses, andererseits sind sie auch Hauptzielscheibe. Die Zelle verfügt über verschiedene Schutzmechanismen, um oxidativen Stress zu bekämpfen. Bei Überlastung des antioxidativen Systems kann oxidativer Stress Schaden anrichten (*Lee HC, 2007*).

1.2.1. Begriffsbestimmung oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress versteht man die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen reaktionsfreudigen Molekülen, - v.a. sogenannte freie Radikale, aber auch anderer Verbindungen („reactive species“, RS) - und antioxidativ wirkenden Substanzen zu Gunsten der freien Radikale. D.h. die Schutzmechanismen der Zelle reichen nicht mehr aus, um die aggressiven Moleküle zu neutralisieren. Es besteht die Gefahr von Gewebeschäden. Besonders gefährdet sind Lipide, Proteine, DNA und RNA. Die oxidativen Veränderungen dieser Strukturen führen zu schweren funktionellen Beeinträchtigungen. Deshalb setzen aerob lebende Zellen verschiedenste enzymatische und nicht-enzymatische Schutzmechanismen ein (*Halliwell B, 2006a*).

1.2.2. Ursache und Wirkung von oxidativem Stress

Ursächlich für oxidativen Stress ist der Sauerstoff-(O₂)-Bedarf der Menschen bzw. diverser Tiere. Ohne O₂ sind viele Organismen nicht lebensfähig. Allerdings kann Hyperoxie toxisch und damit auch neurotoxisch wirken (*Chavko M, 2003*). In Rahmen der ETC u.a. metabolischer Reaktionen fällt der Großteil der RS in Form von ROS in den Mitochondrien an. Wichtigste Produzenten der mitochondrialen ROS sind Komplex I und Komplex III der ETC (*Balaban RS, 2005; Murphy MP, 2009*). Über experimentelle Manipulationen, die das Redoxpotential von Komplex I (*Kushnareva Y, 2002*) bzw. Komplex III (*Chen Q, 2003*) erhöhen, kann generell die ROS-Produktion gesteigert werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass das Redox-Potential im Bereich von Komplex I und Komplex III wichtig für die Formation von ROS ist (*Balaban RS, 2005*). Insgesamt spielt Komplex I über zwei verschiedene Mechanismen eine herausragende Rolle für eine hohe O₂^{•-}-Produktion: Zum einen über retrograden Elektronentransport bei hohem elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) und reduziertem Coenzym Q-(CoQ)-Pool, zum anderem durch Flavinmononukleotid (FMN). Stellen Mitochondrien aktiv ATP her, ist die Rate an O₂^{•-}-Produktion deutlich niedriger als im Ruhestadium. Dies impliziert, dass in vivo Bedingungen, die zu einem retrograden Elektronentransport oder einer Akkumulation von Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) führen, die O₂^{•-}-Produktion begünstigen (*Murphy MP, 2009*).

Die folgende Tabelle soll einen Überblick über weitere mitochondriale ROS-Quellen geben, wobei die Daten auf Experimenten an isolierten Enzymen oder Mitochondrien beruhen. Ihr Beitrag zu der mitochondriale ROS-Produktion unter physiologischen Bedingungen bleibt noch unklar (*Andreyev AY, 2005*).

Tabelle 1: Übersicht über zusätzliche mitochondriale ROS-Quellen

Enzym	Metabolische Funktion	Referenz
Cytochrom b5 Reduktase	ETC	(<i>Whatley S., 1998</i>)
Monoaminoxidase (MAO A/B)	Oxidation biogener Amine; im Hirn auch Neurotransmittersynthese	(<i>Hauptmann N., 1996</i>)
Dihydroorotatdehydrogenase (DHOC)	Pyrimidinnukleotidsynthese	(<i>Forman JH, 1975, 1976</i>)
α -Glycerolphosphatdehydrogenase (GPDH)	Lipidmetabolismus; Regenerierung von zytosol. NAD^+ über Glycerol-Phosphat-Shuttle	(<i>Miwa S., 2003</i>)
Succinatdehydrogenase (SDH)	ETC	(<i>Zhang L., 1998</i>)
Aconitase	TCA	(<i>Vasquez-Vivar J., 2000</i>)
α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplex (KGDHC)	TCA	(<i>Tretter L., 2004</i>)

Einige Arten an RS werden nicht sofort eliminiert, da ihnen eine biologische Funktion zukommt: Sie dienen als intrazelluläre Übermittler von Informationen, dadurch dass sie in eine Reihe von Signalkaskaden involviert sind (*Balaban RS, 2005; Starko AA, 2008*).

Des Weiteren nehmen sie zum einen direkt an der Infektionsabwehr teil (*Dowling DK, 2009*), zum anderen stellen sie wichtige Koordinatoren der Entzündungsantwort dar (*Shelton MD, 2008*).

Andererseits besteht bei zu hohen RS-Spiegeln die Gefahr der Gewebeverletzung: So kommt es bei Wiederholung von entsprechenden Ereignissen zu kumulativen Schäden, die bei Überschreiten einer Schwelle letztlich zu chronischen Krankheiten führen (*Halliwell B, 2006b*).

Oxidativer Stress auf hohem Niveau bedeutet eine suffiziente Energieversorgung für die Zelle, zugleich bergen hohe ROS-Levels die Gefahr der Schädigung der Zelle. Insofern ist der Umfang des oxidativen Stresses immer ein Kompromiss (*Dowling DK, 2009*).

In höheren Konzentrationen können ROS bedeutenden Schaden an Zellstrukturen, Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen anrichten (*Valko M, 2006*). V.a. das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) ist bekannt dafür, mit sämtlichen Komponenten des DNA-Moleküls zu reagieren, so dass sowohl Purin- und Pyrimidinbasen als auch das Desoxyribose-Rückgrat geschädigt werden (*Halliwell B, 1999*). Dabei zählt die Bildung von 8-Hydroxy-Guanosin (8-OH-G) zu der meist untersuchten DNA-Läsion. Die permanente Modifikation des genetischen Materials, verursacht durch oxidative Schadensereignisse, stellt den ersten Schritt für Mutagenese, Karzinogenese und Altern dar (*Valko M, 2007*).

Des Weiteren ist bekannt, dass Metall-induzierte ROS-Generation nicht nur Schäden an der DNA bedingen, sondern auch andere zelluläre Komponente wie die besonders empfindlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren attackieren. Damit sind von diesem Mechanismus v.a. Membranen (inkl. Mitochondrienmembran) betroffen (*Siems WG, 1995*). Nach Bildung eines Peroxylradikals ($\text{ROO}\cdot$) kann das mutagene Malondialdehyd (MDA) gebildet werden (*Mao H, 1996*). 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) stellt eines der toxischen Hauptproduk der Lipidperoxidation dar (*Valko M, 2007*).

In verschiedenen Untersuchungen konnte nach Exposition von Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) bzw. von einem Gemisch aus $\text{O}_2^{\cdot-}$ und $\text{OH}\cdot$ die genauen Mechanismen der oxidativen Schädigung von Proteinen untersucht werden (*Stadtman ER, 2004, Dalle-Donne I, 2003; 2006*).

1.2.3. Neutralisation reaktiver Moleküle

Im Organismus sind diverse antioxidative Mechanismen vorhanden, die die Konzentration schädlicher reaktiver Moleküle auf niedrigem Niveau halten. Prinzipiell können drei Ebenen der oxidativen Stressabwehr unterschieden werden (Löffler G, 2006):

- (1) Die primäre Prävention **verhindert** die **Bildung** reaktiver Moleküle.
- (2) Die sekundäre Prävention **verhindert** ihre **Wirkung**.
- (3) Die tertiäre Prävention **verhindert** das **Fortschreiten** der **Schäden** bzw. die **Entwicklung** von **Komplikationen**.

Hinsichtlich der zu Grunde liegenden Mechanismen unterscheidet man zwischen nicht-enzymatischen und enzymatischen Reaktionen (Löffler G, 2006).

Die folgende Tabelle bietet eine systematische Übersicht über die wichtigsten Abwehrmechanismen (Löffler G, 2006).

Tabelle 2: Übersicht des antioxidativen Abwehrsystems (modifiziert nach Löffler G., 2006)

System	Verbindung	Funktion/Bemerkung
Nicht-enzymatisch	α -Tocopherol (Vitamin E)	Unterbrechung von Radikalketten
	β -Carotin (Vitamin A)	Unterbrechung von Radikalketten, Reaktion mit reaktivem O_2
	Ascorbat (Vitamin C)	Diverse antioxidative Funktionen
	Glutathion	Diverse antioxidative Funktionen
	Harnsäure	Radikalfänger
Enzymatisch	Superoxiddismutasen (verschiedene Isoformen)	Bildung von H_2O_2
	Glutathionperoxidasen (verschiedene Isoformen)	Abbau von Peroxiden
	Katalase	Abbau von Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Enzymatische Hilfsmechanismen	Konjugationsenzyme	Glutathion-S-Transferase Glucuronyltransferasen
	Glutathionregenerierung	Glutathionreduktase
	Reparatursysteme	DNA-Reparatur Abbau oxidierter Proteine und Lipide

1.2.3.1. Primäre Prävention der Reaktiven Spezies

Einerseits sind einige Übergangsmetalle an der Bildung von RS beteiligt, andererseits existieren einige Metalloenzyme, die O_2 -abhängige Reaktionen katalysieren, ohne dass ROS entstehen. Prominentes Beispiel hierfür ist die COX: Der spezifische Aufbau im aktiven Zentrum des Enzyms wirkt der Entstehung schädigender Sauerstoffspezies entgegen (Berg JM, 2007; Brzezinski P, 2008).

Einen anderen Ansatzpunkt im Sinne der primären Prävention stellen diverse Enzymsysteme dar, die niedrige O_2 -Levels bewirken. Zu dieser Gruppe zählen beispielsweise die Glutathion-S-Transferasen (Löffler G, 2006).

1.2.3.2. Sekundäre Prävention der Reaktiven Spezies

Bei den Substanzen aus dieser Gruppe handelt es sich um Antioxidanzien im engeren Sinne. Sie inaktivieren RS und beugen so der schädigenden Wirkung vor (Löffler G, 2006).

Unter den nicht-enzymatischen Antioxidantien treten zwei Vitaminderivate besonders hervor: α -Tocopherol (Vitamin E) wirkt membranprotektiv, in dem es Lipide mit Hilfe von Ascorbat (Vitamin C) vor der Peroxidation schützt. (Parks E, 2000). Vitamin-E-Defizienz führt zu schweren neurologischen Ausfällen, wobei das zentrale Nervensystem (ZNS) stärker als das periphere Nervensystem (PNS) von dem Schaden betroffen ist (Halliwell B, 2006a).

Vitamin-C-Defizienz (bedingt durch Vitamin-C-Transporter-Defekt) führt im Mausmodell postnatal zum akuten Lungenversagen und zerebralen Hämorrhagien. Die Mäuse sterben innerhalb weniger Minuten nach der Geburt. Die Daten implizieren, dass Vitamin C essentiell für Gehirn und Lunge zur Bewältigung der Geburtshyperoxie (rapider Anstieg der Sauerstoffkonzentration auf 21%; die intrauterinen Levels sind deutlich niedriger) ist (*Sotiriou S, 2002*). Im Rahmen der Neuroprotektion ist Vitamin C nicht unumstritten. Jüngere Daten belegen, dass Vitamin C v.a. im vorgeschädigten Hirn oxidativen Schaden weiter vorantreiben kann. Dementsprechend ist der Netto-Effekt durch Vitamin C in Hinblick auf ZNS-Schäden kaum vorhersehbar. Nichtsdestotrotz überwiegt wahrscheinlich der protektive Effekt (*Rice ME, 2000; Huang J, 2001; Halliwell B, 2006a*).

Darüber hinaus verfügen tierische Zellen über eine leistungsstarke Enzymmaschinerie. Zu den wichtigen Vertretern dieser Gruppe zählen die Katalase sowie verschiedene Superoxiddismutasen und Glutathionperoxidasen (*Berg JM, 2007*). Die pathologischen Phänotypen diverser transgener und KO-Mausmodelle für die einzelnen Enzyme veranschaulichen ihre Bedeutung (*Youngmok CJ, 2009*). Genetisch manipulierte Mäuse mit multiplen Defekten antioxidativer Enzyme zeigen einen erhöhten Sensitivitätsanstieg gegenüber oxidativem Stress (*Van Remmen H, 2004*). Jedes Enzym für sich ist essentiell, allerdings entfaltet sich der volle Schutz erst im Zusammenspiel aller Komponenten.

Abbildung 1 und 2 stellen die komplexen Zusammenhänge schematisch dar:

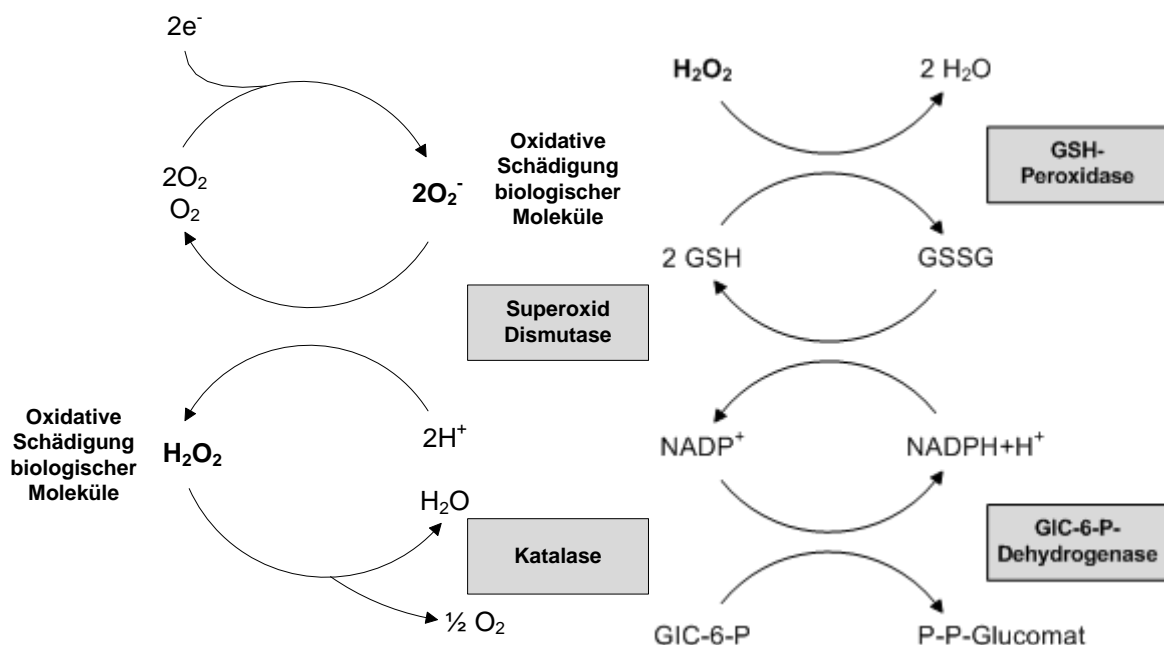


Abbildung 1: Bedeutung diverser Enzyme bei der Entstehung und Beseitigung potentiell schädlicher Moleküle (modifiziert nach Löffler G., 2006)

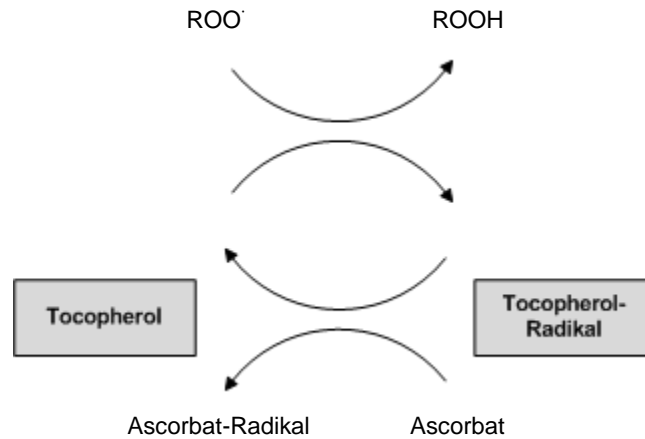


Abbildung 2: Bedeutung von Vitamin E (Tocopherol) und Vitamin C (Ascorbat) bei der Entstehung und Beseitigung potentiell schädlicher Moleküle (modifiziert nach Löffler G., 2006)

1.2.3.3. Tertiäre Prävention der Reaktiven Spezies

Reparaturvorgänge, die oxidativ beschädigte Moleküle beseitigen und ersetzen, sind essentiell für die Integrität der Zelle. Wichtige Elemente der tertiären Prävention umfassen Enzyme der DNA-Reparatur, sowie lipolytische Enzyme, die dem Ersatz von Membranlipiden dienen (Löffler G, 2006). Wie gleicht die Zelle und im Speziellen das Mitochondrium die oxidativ bedingten DNA-Schäden aus? Prinzipiell verfolgen Mitochondrien im Umgang mit mtDNA-Schäden drei Strategien (Berneburg M, 2006):

- (1) Kompensation der geschädigten DNA durch unversehrte DNA. Jüngere Untersuchungen belegen zudem einen einzigartigen Mechanismus, der es Mitochondrien erlaubt, mutierte DNA komplett durch Selektion zu eliminieren (Stewart JB, 2008).
- (2) Degradation der geschädigten mtDNA-Moleküle (Berneburg M, 2006).
- (3) Reparatur des Schadens (Berneburg M, 2006).

Entgegen der lange Zeit vorherrschenden Meinung verfügen auch Mitochondrien über ein effizientes Reparatursystem (Bohr VA, 2002). Dies soll im Folgenden in Abgrenzung zum Reparatursystem der nDNA dargestellt werden.

1.2.3.3.1. Basenexzisionsreparatur

Wesentlicher Baustein des Systems ist die sogenannte „Base excision repair“ (BER, Basenexzisionsreparatur); d.h. schadhafte Basen können ausgeschnitten und entfernt werden. Dieser Reparaturmechanismus umfasst die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1), Uracil-DNA-Glykosylase, Thyminglykolglykosylase, AP-Endonuklease, POLG und die Ligase III (Berneburg M, 2006).

Besonders hervorzuheben ist dabei OGG1, das offenbar für die Integrität der mtDNA von größerer Bedeutung als für die nDNA ist: In OGG1-defizienten Mäusen war die Rate an 8-OH-G (im Vergleich zu Wildtypen) in der mtDNA 20fach, in der nDNA dagegen nur zweifach (deSouza-Pinto N, 2001) erhöht. Mutmaßlich spielt OGG1 in der Prävention von Δ mtDNA eine wichtige Rolle. Einerseits ist die OGG1-Expression im Kleinhirn besonders hoch, einer Region, die selbst im hohen Alter nur sehr wenige Δ mtDNA aufweist (Meissner C, 2006); andererseits weisen Neurone gealterter Mäuse verminderte OGG1-Levels auf, so dass

es vermehrt zu DNA-Doppelstrangbrüchen kommt, die an der Entstehung von Δ mtDNA beteiligt sind (Rolseth V, 2008).

Erwähnenswert ist auch ein besonderer Aspekt der POLG: Sie besitzt zusätzlich eine korrekturlesende Funktion. Genetisch manipulierte Mäuse ohne diese Funktion, zeigten Zeichen des vorzeitigen Alterns bei verkürzter Lebensdauer und eine Akkumulation von Mutationen in der mtDNA (Trifunovic A, 2004).

1.2.3.3.2. Basenfehlpaarungsreparatur

Während der Mechanismus der „mismatch repair“ (MMR, Basenfehlpaarungsreparatur) für die nDNA etabliert ist, erscheint sie für die mtDNA nach wie vor fragwürdig (Berneburg M, 2006). In jüngsten Arbeiten konnte allerdings ein funktioneller MMR-Pathway für Mitochondrien identifiziert werden (deSouza-Pinto NC, 2009).

1.2.3.3.3. Doppelstrangbruchreparatur

Dagegen gibt es eindeutige Hinweise auf mitochondriale Mechanismen der „double-strand break repair“ (DSBR, Doppelstrangbruchreparatur). Doppelstrangbrüche werden v.a. via homologer Rekombination repariert. Zudem bietet die DSBR nicht-homologe Optionen der Verbindung freier DNA-Enden. Hierbei dürften v.a. die DNA-Enden bindenden Proteine Ku 70 und Ku 80 eine Rolle spielen. Sie können freie DNA-Enden detektieren und binden (Berneburg M, 2006).

1.2.3.3.4. Nukleotidexzisionsreparatur

Nach aktuellem Kenntnisstand verfügt die mtDNA, im Gegensatz zu der nDNA, nicht über eine „nucleotide excision repair“ (NER, Nukleotidexzisionsreparatur) (Berneburg M, 2006).

Zusammengefasst verfügt die mtDNA also im Vergleich zur nDNA über weniger Reparaturoptionen (Moran NA, 1996), bei gleichzeitig a priori erhöhten Mutationsraten (Brown WM, 1979). Die humane mtDNA (und auch die mtDNA anderer Spezies) weist ein zehnfach höheres Niveau an Variationen pro Nukleotid als die nDNA auf (Brown WM, 1979).

1.3. Mitochondrien

Ziel der Arbeit ist die Darstellung der komplexen Zusammenhänge von oxidativem Stress, Mitochondrien und Alterungsprozess. Für das Verständnis ist die Auseinandersetzung mit den physiologischen und genetischen Grundlagen des Organells essentiell. Ebenso soll auf die Pathologie der Mitochondrien eingegangen werden.

Bei Mitochondrien handelt es sich um semiautonom reproduzierende Organellen innerhalb eukaryotischer Zellen. Sie zeichnen sich durch eigenes genetisches Material aus, das mitochondriales Genom (Mitom) genannt wird (*Scheffler IE, 1999*). Die mtDNA wird maternal vererbt und enthält viele Polymorphismen; so dass die Analyse der mtDNA ein wichtiges Werkzeug der Populationsgenetik zur Rekonstruktion von phylogenetischen Zusammenhängen darstellt (*Bullerwell CE, 2004*).

Gemäß der Endosymbionten-Theorie entstanden Mitochondrien vor ca. zwei Milliarden Jahren, aus der Symbiose von einem α -Proteobakterium, das zur oxidativen Phosphorylierung fähig war, mit einer Zelle. Auf diese Weise konnte eine stabile, endosymbiotische Beziehung etabliert werden (*Blankenship RE, 1998; Gray MW 1999; Pollard TD, 2007*).

Mitochondrien bestehen aus zwei membranumhüllten, ineinanderliegenden Kompartimenten. Hauptaufgabe der inneren Membran ist es, Energie aus Metaboliten des Intermediärstoffwechsels in die universelle Energieeinheit ATP umzuwandeln. Dabei sind auch Proteine des intermembranösen Raums beteiligt, die darüber hinaus nach Freisetzung ins Zytoplasma auch den programmierten Zelltod auslösen können (*Green DR, 2004*). Der Proteinimport erfolgt streng reguliert und kontrolliert über spezielle Translokasen (*Koehler CM, 2004; Pollard TD, 2007, Ahting U, 2008*).

Zahl und Form der Mitochondrien variieren je nach Zelle, Gewebe und metabolischen Status (*Scheffler IE, 1999; Pollard TD, 2007*).

1.3.1. Besonderheiten der mitochondrialen Genetik

Das Mitochondrium zeichnet sich als Zellorganell dadurch aus, dass es über ein eigenes Erbgut verfügt, das in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist. Die Replikation erfolgt weitgehend unabhängig vom Zellzyklus. Außerdem weist die mtDNA im Vergleich zur nDNA eine Reihe von Besonderheiten auf. Wesentliche Aspekte werden im Folgenden ausgeführt (*Scheffler IE, 1999*).

(1) Die maternale Vererbung:

Sämtliche mtDNA, die die Zygote erhält, stammen von der Oozyte, d.h. eine Mutter mit Mutationen wird diese an Söhne und Töchter weitergeben, jedoch können nur Töchter die Mutationen an nachfolgende Generationen übertragen (*Wallace DC, 1999*). Ein jüngst entdeckter Mechanismus („purifying selection“) ermöglicht es der Natur, pathogene Mutationen in Keimbahnzellen auszusortieren, so dass die mtDNA-Defekte nicht an die Nachkommen weitergegeben werden (*Stewart JB, 2008*).

(2) Das Phänomen der Heteroplasmie (Schwellenwerteffekt):

Im Gegensatz zu dem diploiden nukleären Genom existieren von der mtDNA pro Zelle mehrere 100 bis 1000 Kopien. Existieren innerhalb einer Zelle zwei oder mehr Allele der mtDNA in einem variablen Verhältnis, spricht man von Heteroplasmie. Analog dazu beschreibt der Begriff Homoplasmie das Vorliegen eines einzigen Allels. Erreicht der Anteil mutierter mtDNA einen bestimmten Wert,

wird der genetische Defekt durch biochemische Funktionsstörungen symptomatisch (*Wallace DC, 1999*). Je nach Zelltyp und Art der Mutation variiert der Schwellenwert: Für Δ mtDNA liegt er typischerweise bei ca. 60% (*Sciacco M, 1994*), für Punktmutationen bei ca. 85% (*Boulet L, 1992; Chomym A, 1992*). Interessanterweise korreliert der Grad der Heteroplasmie mit der Manifestationsstärke (*Wallace DC, 1999*).

(3) Die mitotische Segregation:

Bei der Zellteilung kann sich der Anteil mutierter mtDNA in den Tochterzellen ändern. Kommt es dabei zur Überschreitung des pathogenen Schwellenwerts, kann sich der Phänotyp ändern. Dementsprechend kann man bei Mitochondriopathien häufig im zeitlichen Verlauf Variabilitäten der Krankheitssymptome - meist leider im Sinne einer Progression - beobachten (*Wallace DC, 1999*).

Jedes Mitochondrium enthält vier bis zehn Moleküle mtDNA und jede Säugetierzelle enthält 1000 bis 100000 Kopien der zirkulären mtDNA (*Wallace DC, 1999*). Das menschliche Mitom ist mit 16569 Bp relativ klein. Andererseits ist der Informationsgehalt im Verhältnis zur Größe hoch, was u.a. auf das Fehlen von Introns - von einer ca. 1 kbp kleinen nicht-codierenden Region abgesehen - zurückzuführen ist. 37 Gene kodieren für 13 Proteine der Atmungskette bzw. der mitochondrialen Membranen und für zwei ribosomale RNAs (rRNAs) und 22 transfer RNAs (tRNAs). Dem gegenüber steht der Bedarf von über 600-1000 mitochondrialen Proteinen, die für die Atmungskette sowie für Struktur und Reproduktion benötigt werden. Diese werden nukleär codiert, im Zytoplasma synthetisiert und ins Mitochondrium importiert (*Pollard TD, 2007*).

1.3.2. Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien werden populärwissenschaftlich gerne als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet. Allerdings wäre es zu kurz gegriffen, die Funktion dieses Zellorganells auf die bloße Energieproduktion zu reduzieren. Nichtsdestotrotz spielen sie die entscheidende Rolle in der Energieversorgung der Zelle: In ihrem Kompartiment ist die Atmungskette lokalisiert, die maßgeblich für die ATP-Produktion der Zelle ist. Eine weitere Beteiligung der Mitochondrien am Metabolismus findet im Rahmen der β -Oxidation und des Citratzyklus (TCA) statt (*Berg JM, 2007*).

Darüber hinaus sind Mitochondrien mitverantwortlich für die Calcium-(Ca^{2+})-Homöostase: bei erhöhten Ca^{2+} -Konzentrationen werden die Ionen von Mitochondrien aufgenommen, so dass die zellschädigende Wirkung abgepuffert wird und der programmierten Zelltod, genannt Apoptose, auslöst wird. Außerdem synthetisieren sie (partiell) Pyrimidine und Häm sowie Fe-S-Cluster, die von einigen Enzymen benötigt werden. Schlussendlich sei ergänzt, dass in den Mitochondrien die Transkription, Translation und Replikation der mtDNA stattfindet (*Pollard TD, 2007*). Die folgenden Ausführungen beschränken sich auf die, für die Arbeit relevanten Aspekte, Apoptose, Energieproduktion und Biogenese der Mitochondrien.

1.3.2.1. Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt einen zellulären Suizid bedingt durch die Aktivierung eines vorgegebenen zellulären Programms. Apoptose geht, im Gegensatz zum nicht-apoptotischen programmierten Zelltod, mit charakteristischen strukturellen Änderungen einher. Mitochondrien spielen in der Entscheidung über Leben oder Tod der Zelle eine herausragende Rolle (*Lockshin RA, 2001*).

1.3.2.2. Atmungskette und Energiestoffwechsel

Die mitochondriale Energiegewinnung erfolgt über die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) der Atmungskette. OXPHOS setzt sich aus fünf Enzymkomplexen zusammen. Komplex I, II, III, IV stellen die ETC dar, welche mit Hilfe von atomarem Sauerstoff Wasserstoffatome von Kohlenhydraten und Fetten oxidieren. Abgesehen von Komplex II bestehen alle Komplexe u.a. auch aus mitochondrial kodierten Proteinen. Die Energie, die bei der ETC frei wird, wird zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten ($\Delta\Psi$) genutzt, indem Protonen durch die innere mitochondriale Membran gepumpt werden. Die Reduktion des O_2 zu H_2O ist also über $\Delta\Psi$ an die Phosphorylation von ADP gekoppelt. Bei hohen exogenen ADP-Leveln erfolgt die ATP-Synthese über Komplex V durch Ausweitung des $\Delta\Psi$ und O_2 wird über die Atmungskette verbraucht, um $\Delta\Psi$ wiederherzustellen (state-III-Atmung). Ist jedoch das niedrige ADP-Niveau der limitierende Faktor, wird $\Delta\Psi$ vermindert, das Tempo der ETC verlangsamt sich und der O_2 -Verbrauch wird damit niedrig gehalten (state-IV-Atmung). Das Verhältnis aus state-III-Atmung zu state-IV-Atmung wird „respiratory control ratio“ (RCR) genannt (Kokoszka JE, 2001).

Annähernd 0,4 bis 4% des molekularen O_2 , der von den Mitochondrien verbraucht wird, resultiert in einer toxischen Nebenreaktion: Ausgehend von den initialen Schritten der ETC wird statt der Umsetzung zu H_2O , über den Transfer eines einzelnen Elektrons, das hoch toxische $O_2^{\cdot-}$ gebildet. Die Hauptquelle für solche Elektronen, die $O_2^{\cdot-}$ bilden, ist Komplex I (Chance B, 1979; Turrens JF, 1985; Murphy MP, 2009). Die SOD2 setzt die $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 um. Das mitochondriale H_2O_2 wird dann von der Gluthationperoxidase-1 (Gpx-1) zu H_2O reduziert. H_2O_2 kann allerdings in der Gegenwart von reduzierten Übergangsmetallen über die sogenannte Fenton-Reaktion auch zu dem hoch toxischen $OH\cdot$ konvertiert werden (Giulivi C, 1995). Bei Hemmung der mitochondrialen OXPHOS steigt die Rate der missgerichteten Elektronen der ETC und konsekutiv die ROS-Produktion. Dementsprechend ist die ROS-Produktion im Ruhestadium (state-IV-Atmung) höher als im aktivierten Stadium (state-III-Atmung). Überschreitet die ROS-Konzentration die Entgiftungskapazität der Mitochondrien bzw. der Zelle, kann der daraus resultierende chronische Stress die mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore (mtPTP) öffnen (Petronilli V, 1994; Zoratti M, 1995). Dies resultiert in dem Kollaps von $\Delta\Psi$, dem Verlust von Matrixflüssigkeit und der Schwellung des Mitochondriums, das die Freisetzung von Cytochrom C (Cyt c), den Procaspasen-2, -3 und -9, apoptosis-initiating factor (AIF) und der Caspase-aktivierten-DNase verursacht. Damit wird die Degradation zellulärer Strukturen initiiert (Liu X, 1996). Abgesehen von oxidativem Stress kann mtPTP durch vermindertes $\Delta\Psi$, durch niedrige Levels an ADP und ATP in der Matrix und/oder durch die exzessive Aufnahme von Ca^{2+} aktiviert werden (Bernardi P, 1992; Lapidus RG, 1994). D.h. verminderte mitochondriale Energieproduktion und/oder mitochondrialer oxidativer Stress können Apoptose und in der Folge auch Gewebeverfall und Seneszenz verursachen. Damit wird deutlich, wie stark die einzelnen Funktionen (ETC, Apoptose, Ca^{2+} -Homöostase) Hand in Hand gehen.

1.3.2.3. Biogenese der Mitochondrien und Aufrechterhaltung der mtDNA

Die Regulation der mitochondrialen Biogenese und der mtDNA erfolgt über die abgestimmte Expression nukleärer und mitochondrialer Gene. Hormone und sekundäre Botenstoffe senden eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale, die berücksichtigt werden müssen, um eine ausreichende Zahl an Mitochondrien zu gewährleisten, so dass der Energiebedarf gedeckt werden kann. Man nimmt an, dass ROS der ETC an der Signalübermittlung von den Mito-

chondrien zum Nukleus beteiligt sind. Wahrscheinlich ist erhöhter oxidativer Stress unter pathologischen Bedingungen und im Rahmen des Alterungsprozess an einer Änderung der Mitochondrienzahl, der mtDNA-Kopien bzw. -Integrität in der menschlichen Zelle wesentlich beteiligt. (Lee HC, 2000b).

1.3.2.3.1. Biogenese der Mitochondrien

Das Wachstum der Mitochondrien erfordert einen Import der meisten der hierfür benötigten Proteine aus dem Zytoplasma, die interne Synthese einiger Proteine sowie die Replikation des Genoms (Lee HC, 2005). Die im Zytoplasma synthetisierten mitochondrialen Proteine werden mit Signal- und Zielsequenzen versehen, die sie zu ihrem Bestimmungsort dirigieren (Pfanner N, 2000).

Ähnlich wie Zellen teilen sich Mitochondrien, aber im Gegensatz zu den meisten Zellen fusionieren sie auch mit anderen Mitochondrien. Bereits vor hundert Jahren wurden die Vorgänge der Fusion und Fission beobachtet. Inzwischen ist bekannt, dass das Gleichgewicht zwischen ständiger Fusion und Fission bestimmend für die Zahl der Mitochondrien innerhalb einer Zelle sind. Sowohl Fusion als auch Fission sind abhängig von Proteinen mit Guanintriphosphatase-(GTPase)-Domänen, die verwandt sind mit Dynamin, einem Protein, das bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielt (Pollard TD, 2007).

Funktionsverluste der Fusionsproteine führen zu Zellen mit zahlreichen kleinen Mitochondrien, einige weisen auch eine verminderte Zahl an mtDNA-Molekülen auf. Humane Mutationen in den Genen für Fusionsproteine resultieren in Defekten der Myelinscheide mit geschädigten Axonen (hierbei handelt es sich um eine Form der Charcot-Marie-Tooth Krankheit) und in einer Atrophie des optischen Sehnervs. Mitochondriale Fusionsproteine werden auch für die Apoptose benötigt (Pollard TD, 2007; Hudson G, 2008).

1.3.2.3.2. Replikation der mtDNA

Die Replikation der mtDNA erfolgt vorwiegend in der späten S- und G₂-Phase des Zellzykluses, im Prinzip ist die Replikation allerdings während des gesamten Zellzykluses möglich (Bogenhagen D, 1977). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die mtDNA-Replikation nicht simultan zu Wachstum und Teilung des Organells stattfindet (Shadel GS, 1997). D.h. die mtDNA-Replikation ist nicht zwangsläufig an die mitochondriale Proliferation gekoppelt. Beim Menschen variiert die Zahl der mtDNA-Kopien je nach Zelltyp der Gewebearten und wird normalerweise innerhalb eines Schwankungsbereichs konstant gehalten (Moraes CT, 2001). Unter normalen physiologischen Bedingungen verdoppelt sich jedes mtDNA-Molekül pro Zellzyklus, so dass jede Tochterzelle eine Kopie erhält und die Quantität der mtDNA aufrechterhalten wird. Ändern sich die physiologischen Bedingungen, kann die Zahl der Kopien dem Energiebedarf der Zelle angepasst werden. Zahlreiche Publikationen belegen, dass die Zahl der Kopien in bestimmten Geweben während Zellwachstum und -differenzierung und nach Hormonbehandlung bzw. körperlicher Anstrengung moduliert wird (Williams RS, 1986; Renis M, 1989; Shay JW, 1990; Wiesner RJ, 1992). Nichtsdestotrotz verbleiben eine Reihe ungelöster Fragen in Hinblick auf die Regulation der Replikation unter bestimmten physiologischen und Entwicklungsbedingungen.

1.3.2.3.2.1. Steuerung durch nukleäre Gene

Die Aufrechterhaltung der mtDNA-Kopienanzahl ist ein komplexer Prozess, der u.a. über die Expression bestimmter nukleärer Gene gesteuert wird (*Shadel GS, 1997*).

NRF-1 und NRF-2 regulieren u.a. die Expression zahlreicher anderer Gene, die an der mtDNA-Replikation beteiligt sind (*Evans MJ, 1990*). Der mitochondriale Transkriptionsfaktor A (mtTFA, syn. TFAM) reguliert u.a. die Replikation und die Transkription des Mitoms (*Virbasius JV, 1994*). Es konnte gezeigt werden, dass das TFAM-Gen sowohl für NRF-1 als auch für NRF-2 eine Bindungsstelle enthält. Diese Einrichtung ermöglicht die Vernetzung der Expression nDNA-codierter Proteine mit der Transkription mtDNA-codierter Gene (*Virbasius JV, 1994*). Peroxisomen-proliferationsaktivierter-Rezeptor- γ -Coaktivator-1 α (PGC-1 α) gilt als wichtiger Regulator der mitochondrialen Biogenese (*Puigserver P, 2003*). Neben anderen Faktoren können auch POLG, die mitochondriale RNA-Polymerase, TFAM, Endonuklease G, mtDNA-singel-Strang-bindendes-Protein (mtSSB) Replikation bzw. Transkription der mtDNA und die Prozessierung der mtRNA regulieren (*Shadel GS, 1997, Moraes CT, 2001*). In Vertebraten ist POLG für die Biosynthese der mtDNA verantwortlich (*Shadel GS, 1997*).

Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit Mangel an mtDNA-Kopien, POLG in stabiler Form und auf normalen Levels exprimiert wird (*Davis AF, 1996*). Offenbar korreliert die POLG-Menge nicht mit der Menge an mtDNA innerhalb einer Zelle. Dagegen variiert die Menge an mtDNA im Einklang mit der Menge an TFAM innerhalb einer Zelle (*Shadel GS, 1997*). Trotzdem bleibt unklar, ob die beobachteten Veränderungen in der Kopienanzahl Konsequenz einer veränderten Replikationsrate der mtDNA ist, die über die TFAM-Konzentration innerhalb einer Zelle bestimmt wird. Das TFAM^{-/-}-KO-Mausmodell unterstreicht die physiologische Bedeutung von TFAM für die Gewährleistung einer adäquaten mtDNA-Molekülzahl und damit einer effizienten Energieversorgung (*Larsson NG, 1998*).

1.3.2.3.2.2. Einfluss mitochondrialer Signale auf nukleäre Atmungsgene

Mitochondrien und Nukleus stehen im ständigen Informationsaustausch, um die mitochondriale Biogenese optimal den Bedürfnissen der Zelle anzupassen (*Starkov AA, 2008*). Über welche Mechanismen ist es möglich, dass auch ein retrograder Informationsfluss von den Mitochondrien zu dem Nukleus möglich ist?

Mitochondrien gelten als Hauptquelle ROS und als größter Calcium-Speicher der Zelle. Wahrscheinlich führen Änderungen des Redox-Status oder veränderte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen zu Änderungen in mitochondrialen Funktionen und ermöglichen auf diese Weise eine Kommunikation zwischen Mitochondrien und Nukleus (*Starkov AA, 2008*). Defekte der ETC im Rahmen von mitochondrialen Erkrankungen (*Wei YH, 2003*) oder bei älteren Individuen (*Wei YH, 2002*) gehen mit erhöhter mitochondrialer O₂⁻-Produktion einher. Zudem konnte beobachtet werden, dass humane Zellen auf funktionell relevante ETC-Defekte über einen H₂O₂-abhängigen Signalweg mit einer verstärkten Expression nukleärer und mitochondrialer Gene reagieren (*Suzuki H, 1998*). Offenbar nehmen ROS eine Signalfunktion im Rahmen der Kommunikation zwischen Mitochondrien und Nukleus ein (*Poyton RO, 1996*). Darüber hinaus führen in Säugerzellen sowohl mtDNA-Mutationen bzw. -Depletionen als auch metabolischer Stress mutmaßlich zu einer Übertragung als retrogrades Ca²⁺-Signal, das die Expression nukleärer OXPHOS-Gene und damit die mitochondriale Biogenese verändert (*Biswas G, 1999, 2003*).

1.3.5.3.3. Mitochondriale Biogenese und mtDNA Aufrechterhaltung unter oxidativem Stress

Es besteht eine Assoziation zwischen erhöhten intrazellulären ROS-Levels und Änderungen der Mitochondrienanzahl, der mtDNA-Molekülzahl und der Expression respiratorischer Gene. Eine Assoziation zwischen erhöhter mtDNA-Molekülzahl pro Zelle und erhöhtem oxidativen Stress ist für gealtertes Gewebe der Ratte (*Gadaleta M, 1992*), sowie für Gehirn (*Barrientos A, 1997a*), Lunge (*Lee HC, 1998*) und Skelettmuskel (*Barrientos A, 1997b, Pesce V, 2001*) be- tagter Individuen gut belegt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass diploide humane Zellen in der späten Passage erhöhte mtDNA-Molekülzahlen aufweisen (*Shmookler RJ, 1983*). Offenbar ist der Anstieg der mtDNA in alterndem Gewebe Resultat eines Rückkopplungsmechanismus zum Ausgleich der defekten Mitochondrien mit beschä- digter ETC oder mutierter mtDNA, um eine suffiziente Energieversorgung der Zelle weiterhin zu gewährleisten (*Lee HC, 2000b*).

Besonders empfindlich gegenüber Schädigung durch elektrophile Molekülen ist die D-Loop- Region. Im Vergleich zu anderen Regionen der mtDNA ist sie deutlich stärker von dem oxidativen Schaden betroffen (*Mambo E, 2003*).

Milder oxidativer Stress könnte positive Konsequenzen für die Zelle - im Sinne eines An- stiegs der Mitochondrienzahl und des mtDNA-Gehaltes - haben (*Lee HC, 2000b; 2002*). Der Anstieg wird mutmaßlich durch die verstärkte Expression nukleärer Gene bewirkt (*Suzuki H, 1998; Suliman HB, 2003*).

Bei der Beurteilung der oxidativen Stressantwort hinsichtlich des Resultats für die Zelle müs- sen zwei potentielle Aspekte berücksichtigt werden. Einerseits könnte die Stimulation der Proliferation einen Ausgleich des Energiemangels bewirken. Andererseits könnte die exzessi- ve ROS-Produktion weiteren Schaden verursachen und damit könnte sie auch Prozesse wie Alterung oder Zelltod anstoßen (*Bladier C, 1997; Chen QM, 1998*).

Das Endergebnis der Ereignisse, die zu einem Anstieg der Mitochondrien und der mtDNA- Moleküle führen, ist abhängig vom Ausmaß des oxidativen Stress, der intrazellulären antioxidativen Kapazitäten und der Mitochondrien- bzw. der mtDNA-Qualität. Zellen mit leistungsstarken antioxidativen Systemen und qualitativ „guten“ Mitochondrien bzw. mtDNA-Molekülen können auf milden oxidativen Stress mit einem Anstieg der Mitochondrien und der mtDNA-Moleküle reagieren. Durch den Anstieg der Mitochondrien könnte der Energiegewinn gesteigert werden. Sind jedoch die Ressourcen des antioxidativen Systems ausgeschöpft, führt die Exposition von Gewebezellen gegenüber stärkerem oxidativem Stress möglicherweise zu einem Anstieg defekter Mitochondrien bzw. mutierter mtDNA und im Sinne eines Teufelskreises zu einem Anstieg der ROS-Produktion und des oxidativen Scha- dens (*Lee HC, 2005*). Überschreitet der oxidative Schaden ein gewisses Maß, könnten Mito- chondrien - hauptsächlich über die Freisetzung von Cyt C - den Zelltod initiieren (*Bernardi P, 1992; Kroemer G, 1998*). Außerdem nimmt man an, dass ein Anstieg der ROS-Konzentration die Peroxidation von Kardiopilin, einem Protein der inneren mitochondrialen Membran, indu- ziert, so dass Cyt c von Kardiopilin dissoziiert (*Imai H, 2003*). Die Freisetzung von Cyt C führt zur Apoptose bzw. Nekrose der Zelle (*Kroemer G, 1998*).

1.3.2.3.5. Signalwege mit Beteiligung an der Regulation der mitochondrialen Biogenese

Während die Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren von ETC-Genen mittlerweile gut verstanden ist, verbleiben hinsichtlich der Regulationsme- chanismen der Expression eine Reihe von Fragen (*Suliman HB, 2003*).

Abbildung 3 soll einen Überblick über die komplexen Reaktionswege geben. Die durchgezogenen Linien symbolisieren etablierte Kaskaden, die gestrichelten vermutete (Lee HC, 2005).

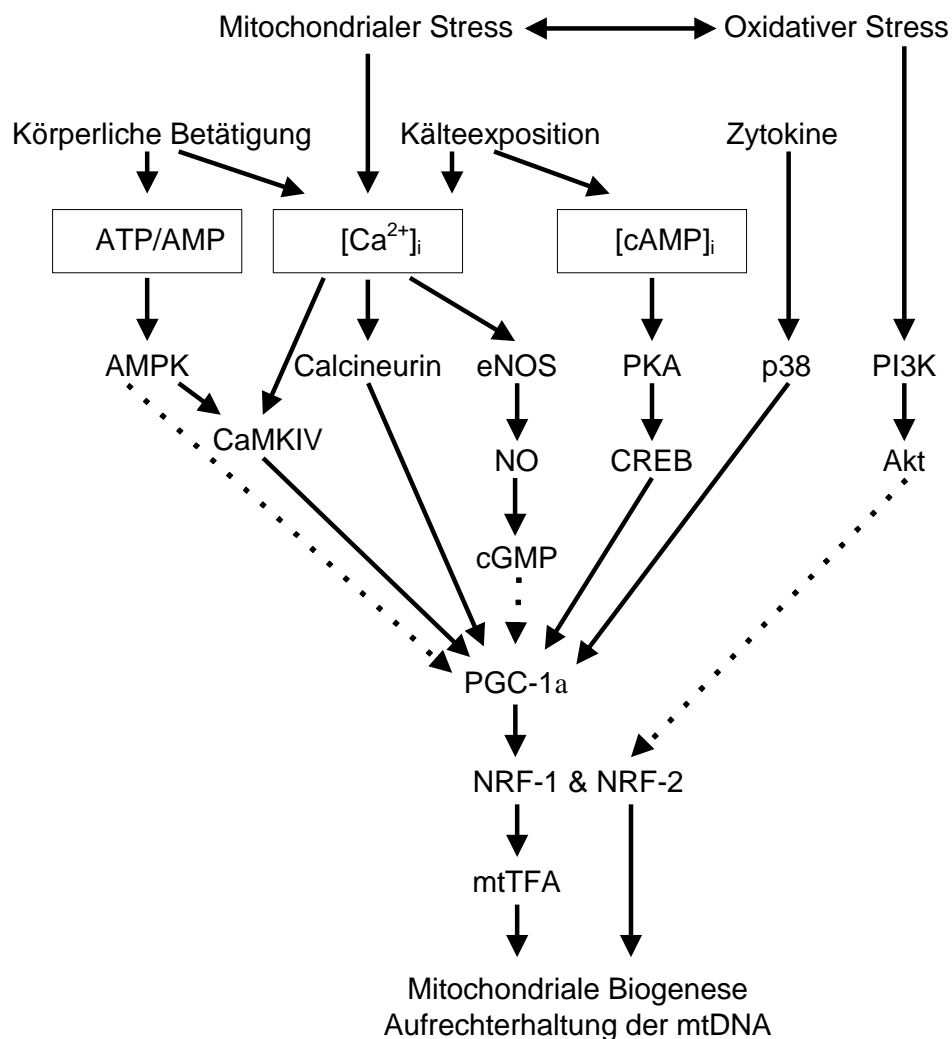


Abbildung 3: Signalkaskaden vermittelte Regulation der mitochondrialen Biogenese (modifiziert nach Lee HC, 2006)

1.3.3. Pathologie der Mitochondrien

Bei Mitochondriopathien handelt es sich um vermeintlich seltene Erkrankungen. Jüngere Zahlen sprechen jedoch dafür, dass v.a. die mtDNA-Mutationen unterdiagnostiziert sind: Epidemiologische Studien belegen eine Prävalenz von mindestens 1:5000 in der Normalbevölkerung (Chinnery PF, 2000; Schaefer AM, 2008). Bei >1 von 200 Lebendgeburten lassen sich pathogene Allele aufspüren und bei mindestens einer von 1000 Geburten treten de novo Mutationen auf (Elliott HR, 2008).

Mitochondriopathien treffen v.a. stoffwechselaktives Gewebe mit einem hohen Energiebedarf, wie Herz, Gehirn, Retina oder Muskel (Wallace DC, 1999). Das Spektrum der zu Grunde liegenden genetischen Veränderung ist ebenso groß wie die Vielfalt der nuancierten Phänotypen (Crimi M, 2008).

Des Weiteren dienen Mitochondriopathien als Modellerkrankungen dem besseren Verständnis mitochondrialer Dysfunktion im Rahmen einiger epidemiologisch sehr relevanter Leiden wie Neoplasien und neurodegenerativer Erkrankungen (*Wallace DC, 1999; Baron M, 2007*).

Dabei vermutet man für mtDNA-Mutationen eine prädisponierende Funktion für Alterungsprozesse (*Baron M, 2007*).

In der Literatur ist ein Anstieg von Mutationen in der mtDNA mit zunehmendem Alter (und auch im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen) für diverse Gewebe gut belegt (*Bender A., 2006; Corral-Debrinski M, 1992; Bua E, 2006*). Ebenso etabliert ist die Assoziation von mitochondrialer Dysfunktion und Alterungsprozessen (*Baron M, 2007; Trifunovic A, 2008*). Der endgültige Beweis eines Kausalzusammenhangs zwischen mtDNA-Mutationen, mitochondrialer Dysfunktion und Alterungsprozessen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen steht allerdings noch aus (*Krishnan KJ, 2007b*). Die folgenden Ausführungen sollen sich auf die Frage der Ursache für gehäufte mtDNA-Mutationen im Alter beschränken.

Eine Reihe von Gründen bedingen die besondere Vulnerabilität der mtDNA gegenüber schädigender Einflüsse, die den Alterungsprozess beschleunigen.

- (1) Im Gegensatz zur nDNA liegt die mtDNA nicht diploid, sondern in multiplen Kopien vor. Dementsprechend ist die „Chance“ größer, dass eine Kopie mutiert. Über klonale Expansion kann sich die neu aufgetretene Mutation ausbreiten (*Bua E, 2006*).
- (2) Die Fixationsrate für spontane Mutationen ist höher als bei nDNA (*Cortopassi GA, 2002*).
- (3) Während nDNA durch Histone geschützt ist, liegt mtDNA „nackt“ vor (*Scheffler IE, 1999*).
- (4) Die mtDNA liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zur ETC, der Hauptquelle mutagener ROS (*Balaban RS, 2005*).
- (5) MtDNA besteht fast ausschließlich aus Introns. D.h. fast jede Mutation ist funktionell relevant und betrifft die ETC als Ganzes (*Cortopassi GA, 2002*).
- (6) Die vorhandenen Reparaturmechanismen sind zwar signifikant, aber bei weitem nicht so leistungsstark, wie die der nDNA. Zudem nimmt die Effizienz des Systems mit dem Alter ab (*Moran NA, 1996*).

Inwieweit dabei erhöhte ROS-Raten eine Rolle spielen, wird derzeit kontrovers diskutiert: Überraschenderweise konnte in POLG-Mäusen trotz deutlich erhöhten Raten an Δ mtDNA sowie Zeichen des vorzeitigen Alterns bei verkürzter Lebensspanne (*Trifunovic A, 2004*) keine gesteigerte ROS-Produktion nachgewiesen werden (*Trifunovic A, 2005; Kujoth GC, 2005*). Zusätzliche Fragen wirft das SOD2^{+/-}-Mausmodell auf: Trotz erhöhtem oxidativen Stress ist die Lebensspanne der Tiere nicht verkürzt (*Van Remmen H, 2003*).

Die Vulnerabilität der mtDNA ist offenbar im Wesentlichen „hausgemacht“, d.h. sie liegt in der speziellen Charakteristik der mtDNA begründet. Der kritische Punkt ist das Alter: Der lange zeitliche Verlauf bis dahin ermöglicht es Zellen postmitotischer Gewebe Mutationen anzuhäufen. Letztlich ist nicht ein Ereignis entscheidend, sondern die Akkumulation vieler mutagener Ereignisse, die erst in der Summe relevant werden.

Prinzipiell können Δ mtDNA während der Reparatur geschädigter mtDNA oder während der mtDNA-Replikation auftreten. Jüngste Arbeiten weisen der erstgenannten Option die Hauptrolle in der Deletionsentstehung zu (*Krishnan KJ, 2008*). Im Einklang dazu steht die Tatsache, dass postmitotisches Gewebe ein niedriges Turnover der mtDNA (vermutlich im Bereich von Tagen) aufweist (*Wang GJ, 1997*). Insofern ist es unwahrscheinlich, dass der Vorgang der Replikation als Ursache für Δ mtDNA eine bedeutende Rolle spielt.

Über den Mechanismus der klonalen Expansion können sich mtDNA-Mutationen innerhalb einer Zelle, aber auch über Zellgrenzen hinweg ausbreiten (*Bender A, 2006; Bua E, 2006*). Über die entsprechenden molekularen Grundlagen ist wenig bekannt. Derzeit stehen zwei

Hypothesen zur klonalen Expansion im Raum: Entweder der zufällige genetische Drift der mtDNA als Hauptursache (*Elson JL, 2001*) oder alternativ wird ein replikativer Vorteil der Δ mtDNA postuliert (*Diaz F, 2002*). Für die zweite Variante sprechen jüngste Ergebnisse aus einem Mausmodell, in dem durch genetische Manipulationen vermehrt Doppelstrangbrüche in der mtDNA induziert werden. Dies führt zu Δ mtDNA. Überraschenderweise konnte die Beobachtung gemacht werden, dass große Δ mtDNA schneller akkumulierten als kleine Δ mtDNA (*Fukui H, 2009*). Offenbar haben kleinere mtDNA-Moleküle einen replikativen Vorteil. Demnach wäre die Replikation Δ mtDNA gegenüber der intakten mtDNA mit voller Länge begünstigt.

MtDNA-Mutationen werden nach Überschreitung einen gewissen Grenzwertes funktionell relevant. Morphologisches Korrelat dafür sind COX-negative Zellen. COX ist ein Enzym der ETC und wird partiell mitochondrial codiert, so dass COX-Negativität ein Indikator funktionell relevanter mtDNA-Schäden darstellt (*Müller-Höcker J, 1989*). Interessanterweise konnte dabei das Phänomen der mitochondrialen Komplementierung beobachtet werden: Theoretisch würde man einen linearen Zusammenhang zwischen dem Anteil an Δ mtDNA und prozentualer COX-Aktivität erwarten. Stattdessen bleibt bis zu einem Deletionsgrad von 75-80% die volle COX-Aktivität erhalten („COX-positive Zellen“; Prinzip der mitochondrialen positiven Komplementierung); unterhalb dieser Werte ist die COX-Aktivität vollständig erloschen („COX-negative Zellen“; Prinzip der mitochondrialen negativen Komplementierung), ungeachtet des verbleibenden Restes an unbeschädigter mtDNA. Zellen mit intermediärer COX-Aktivität konnten nur ganz vereinzelt nachgewiesen werden, die Deletionsgrade lagen hier sehr nahe an der Schwelle zur COX-Negativität. Das Spektrum der COX-Aktivität dagegen umfasste nahezu 100% bis ca 10% (*Nakada K, 2008*). Offenbar folgt der Regulationsmechanismus in der Pathogenese mitochondrialer Erkrankungen, bedingt durch Mutationen in der mtDNA, dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip.

Man geht davon aus, dass die mitochondriale Dysfunktion letztlich zur Apoptose der Zelle führt (*Krishnan KJ, 2007b*). So konnte im TFAM-KO-Mausmodell gezeigt werden, dass ETC-Defizienz, bedingt durch reduzierte mtDNA-Expression, mit gesteigerter Apoptose vergesellschaftet ist (*Wang J, 2001*). Des Weiteren konnte in diversen Geweben von POLG-Mäusen aktivierte Caspase-3, einem Indikator für Apoptose, nachgewiesen werden (*Kujoth GC, 2005*). Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zwischen erhöhten Raten an mtDNA-Mutationen und einem altersabhängigen Verschleiß der Gewebefunktion (*Krishnan KJ, 2007b*).

Zudem ist bekannt, dass das Phänomen der altersabhängigen muskulären Sarkopenie mit mitochondrialer Dysfunktion einhergeht (*Lee CM, 1998; Wangat J, 2001; DiMauro S, 2002; Hiona A, 2008*). Ebenso weisen AD, PD, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Friedreich Ataxie (FDA), Chorea Huntington (HD) u.a. neurodegenerative Erkrankungen in der Pathogenese eine Beteiligung der Mitochondrien im Sinne einer Dysfunktion auf (*Halliwel B, 2006b; Yang JL, 2008*). Interessanterweise konnte bei den genannten Erkrankungen im Gehirn betroffener Patienten auch Zeichen von erhöhtem oxidativen Stress nachgewiesen werden (*Halliwel B, 2006a*). Die folgende Tabelle (*modifiziert nach Halliwel B, 2006b*) soll einen systematischen Überblick vermitteln.

Tabelle 3: Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Schaden im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (modifiziert nach Halliwell B, 2006b)

	<i>Mitochondriale Dysfunktion</i>	<i>Oxidativer Schaden</i>	<i>Referenz</i>
PD	Komplex I ↓, KGDH ↓	<i>SN:</i> GSH ↓; HNE, Lipidperoxide, Isofurane, 8OHdG, 8OHG, Proteincarbonyle, 3-NT, Cysteinyl-DOPA und Cysteinyl-Dopamin ↑	<i>Halliwell B. 2006a</i>
AD	Komplex IV ↓, KGDH ↓	8OHdG in nDNA & mtDNA ↑; 8OHG, Proteincarbonyle, Methionin-Sulfoxide, Nitrotyrosine, Acrolein, HNE, nitrierte/glykierte Proteine u.a. ↑	<i>Reddy P. H. 2005, Ciechanover A., 2005</i>
ALS	Komplex I und IV ↓	<i>Betroffenes Rückenmark:</i> 8OHdG, Proteincarbonyle, HNE, Glykoxidierungsprodukte und 3-NT↑	<i>Halliwell B. 2006a</i>
FDA	Komplex I, II, III und Aconitase ↓; Frataxin ist mitochondriales Fe-S-Protein	<i>Im Urin:</i> 8OHdG ↑; therapeutischer Nutzen des mitochondrial gerichteten Antioxidans Idebenone (CoQ-Analogon)	<i>Halliwell B. 2006a</i>
HD	Komplex II, III, KGDH und Aconitase ↓	<i>Im Liquor:</i> 8OHdG und F ₂ -Isopuran ↑; in Huntingtin-überexprim. Mäusen zusätzl. ox. Schaden	<i>Halliwell B. 2006a</i>

Eine Assoziation von mtDNA-Mutationen, mitochondrialer Dysfunktion, Apoptose mit dem Alterungsprozess ist unbestritten. Allerdings verbleiben noch eine Reihe von Fragen über die genauen Zusammenhänge und Mechanismen in der Pathogenese (*Krishnan KJ, 2007b*).

1.4. SOD2: Mitglied der Superoxiddismutase-Familie

Bei den Superoxiddismutasen (SOD) handelt es sich um eine bei Säugetieren weit verbreitete Enzymfamilie. Wie der Name bereits impliziert, besteht ihre wesentliche Funktion darin, die Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ zu katalysieren. Dabei entsteht O_2 und H_2O_2 . Allgemein versteht man unter einer Dismutation eine Reaktion, bei der ein Stoff simultan reduziert und oxidiert wird (Berg JM, 2007).



Formel 2: SOD-abhängige Dismutation

Das Auftreten der SOD wurde durch die starke Verbreitung fotosynthesebetreibender Organismen vor ca. zwei Milliarden Jahren getriggert. Die SOD entwickelten sich als antioxidativ wirksame Enzyme, um die toxischen Nebenprodukte der O_2 -Verwertung zu neutralisieren. Hierbei entstanden drei kompartimentsspezifische und strukturell unterschiedliche Isoformen (Zelko IN, 2002; Landis GN, 2005).

SOD1 oder auch **CuZnSOD** ist ein Kupfer-/Zink-haltiges Homodimer, das vorwiegend im zytoplasmatischen Raum, aber auch in nukleären Kompartimenten sowie in Lysosomen nachgewiesen werden konnte. (Chang LY, 1988; Keller GA, 1991; Crapo JD, 1992; Liou W, 1993). Das Enzym ist über Fachkreise hinweg bekannt geworden, nachdem Wissenschaftler gezeigt hatten, dass ca. 5% der Patienten mit familiärer Amyotropher Lateralsklerose (fALS) eine Mutation im SOD1-Gen aufweisen (Rosen DR, 1993).

SOD2 oder **MnSOD** existiert als Mangan-haltiges Homotetramer und ist fast ausschließlich mitochondrial lokalisiert (Barra D, 1984; Weisiger RA, 1973; Pfanner N, 2000). Hauptaufgabe ist die Protektion der Mitochondrien vor ROS (Zelko IN, 2002). Besonders für die Integrität Fe-S-haltiger Enzyme (Aconitase, KGDHC u.a.) ist die schützende Funktion essentiell (Li Y, 1995). Darüber hinaus fördert SOD2 zelluläre Differenzierung und Tumorgenese (St. Clair DK, 1994) und schützt vor pulmonaler Toxizität (Wispe JR, 1992).

SOD3 oder **Extra-Cellular-(EC)-SOD**, konnte bisher in humanem Plasma, Lymphe, Aszites und Liquor detektiert werden (Marklund SL 1982, 1986). Das Expressionsmuster unterliegt großen Schwankungen und ist stark abhängig vom spezifischen Zelltyp und der Gewebeart. Mitunter kann die Aktivität der SOD3 die der SOD1 und SOD2 übersteigen (Zelko IN, 2002). Die folgenden Ausführungen fokussieren sich auf die Darstellung der SOD2 in Abgrenzung zu den zwei anderen Isoenzymen.

Das SOD2-Gen ist auf Chromosom 6q25 lokalisiert (Creagan R, 1973; Church SL, 1992). Sowohl für den Menschen (Church SL, 1992; Wan XS, 1994) als auch für die Maus (DiSilvestre D, 1995; Jones PL, 1995) ist das SOD2-Gen komplett sequenziert worden. Ähnlichkeiten hinsichtlich Struktur und Sequenz weisen auf eine starke Konservierung hin (Zelko IN, 2002). Sowohl das humane als auch das murine Gen enthalten mutmaßliche NF- κ B-transkriptionsregulierende-Elemente (Wan XS, 1994; Jones PL, 1995). Interessanterweise spielt NF- κ B eine Rolle in der Signalkaskade der mitochondrialen Biogenese unter oxidativem Stress (Lee HC, 2005). Diese Assoziation impliziert die Möglichkeit einer Hochregulation der SOD2 unter oxidativem Stress.

Die eminente Bedeutung der SOD2 für den Organismus des Säugetiers konnte eindrucksvoll durch diverse KO-Mausmodelle der SOD2 bestätigt werden. Die Auswirkungen des Funktionsausfalls reichen von Letalität bis hin zu Neurodegeneration und massiver Schädigung des Herzens (*Li Y, 1995; Lebovitz RM, 1996*). Unter 1.4.2. werden die verschiedenen SOD2-KO-Mausmodelle im Detail dargestellt.

Zwar ist keine Erkrankung bekannt, wie etwa bei der SOD1 die familiären ALS (fALS) (*Rosen DR, 1993*), die auf Mutationen im humanen SOD2-Gen zurückzuführen wäre, jedoch werden verschiedene genetische Variationen beschrieben, die mit bestimmten Krankheitsbildern assoziiert sind. Verschiedene Polymorphismen werden u.a. mit vorzeitigem Altern (Progerie) (*Rosenblum JS, 1996*), einem geringfügig erhöhten Risiko für sporadische Motoneuron-Erkrankungen (*Van Landeghem GF, 1999*) bzw. für nichtfamiliäre Form einer idiopathischen Kardiomyopathie (*Hiroi S, 1999*) in Verbindung gebracht. Ein Effekt auf die Inzidenz von PD (*Farin FM, 2001*) bzw. ALS (*Parboosingh JS, 1995; Tomkins J, 2001*) konnte nicht nachgewiesen werden. In weiteren Assoziationsstudien konnte bei bestimmten Polymorphismen ein geringfügig erhöhtes Tumorrisiko (1,5-3fach) nachgewiesen werden (*Mitrunen EK 2001, Zhang HJ, 1999; Tomblyn M, 1998*).

1.4.1. Regulation der SOD2-Expression

Einerseits wird SOD2 in vielen Zellarten und Gewebetypen auf relativ hohen Leveln exprimiert, andererseits wird sie auch stark durch intrazelluläre und Umweltfaktoren reguliert (*Zelko IN, 2002*). Es sind zahlreiche Agonisten und Antagonisten der SOD2-Expression bekannt (*Wan XS, 1994; Zhang N, 1996; Yeh CC 1998, Zhu CH, 2001*).

Die wesentlichen Regulationsmechanismen werden im Folgenden kurz ausgeführt.

1.4.1.1. Hochregulierende Stimuli der SOD2-Expression

Die Transkription des SOD2 Gens wird durch eine Bandbreite an Substanzen induziert. Diverse Zytokine gelten als potente Aktivatoren der SOD2 in verschiedenen Geweben (*Masuda A, 1988; Visner GA, 1992; Dougall WC, 1991, Visner GA, 1992a; 1992b; Wong GH, 1988; Harris CA, 1991*). Proteinkinase-C-stimulierende-Agenzien induzieren humane SOD2-Expression über Aktivierung unterschiedlicher Kaskaden (*Kim HP, 1999*). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für bestimmte Chemotherapeutika nachgewiesen werden (*Das KC, 1999*).

1.4.1.2. Herunterregulierende Stimuli der SOD2-Expression

Die Expression der SOD2 ist in vielen Krebsarten auf Grund von Methylierungen bestimmter Sequenzen in der Intronregion vermindert (*Huang Y, 1997, 1999*). Zudem sind die Levels des Transkriptionsfaktors AP2, der mit der 5'-flankierenden Sequenz des SOD2 Gens interagiert, vermindert (*Zhu CH, 2001*).

1.4.1.3. Posttranskriptionale Regulation der SOD2-Expression

Die Expression der SOD2 wird nicht nur auf der Ebene der Transkription, sondern auch auf der Ebene der Translation über ein RNA-bindendes Protein reguliert. Dadurch kann die Translationseffizienz erhöht werden. (*Chung DJ, 1998, Knirsch L, 2000*).

1.4.1.4. Expression der SOD2 im Laufe der Ontogenese

Das Expressionsprofil der SOD2 im Laufe der Ontogenese scheint speziesspezifisch zu sein (Yuan HT, 1996, Clerch LB, 1992, Hayashibe H, 1990, Carbone GM, 1994; Vlessis AA, 1989). Beim Menschen entsprechen sich die Expressionsprofile für SOD1 und SOD2 in etwa; bis zum Erwachsenenalter steigen sie in Lunge und Leber, wobei die Aktivitäten nicht immer mit den mRNA-Levels korrelieren (Asikainen TM, 1998).

1.4.2. Posttranslationale Modifikation der SOD2

Einerseits ist $O_2^{\bullet -}$ Substrat der SOD2, andererseits kann aber auch das Enzym selbst posttranslational via Protein-Tyrosin-Nitrierung modifiziert werden. Dabei werden für die Enzymaktivität essentielle Strukturen angegriffen, so dass letztlich das Enzym inaktiviert wird (Yamakura F, 1998; Quijano C, 2001). Dies ist insofern fatal, weil bei (partiell)em Ausfall der SOD2 die $O_2^{\bullet -}$ -Konzentration ansteigt und damit die Bildung des Peroxynitritradikals ($ONOO^-$) weiter begünstigt wird. Exzessive $ONOO^-$ -Levels können eine Vielzahl mitochondrialer Proteine (inklusive der SOD2) schädigen. Offenbar führt dieser Prozess zur Initiierung eines Teufelskreises an mitochondrialer Schädigung, der mutmaßlich den Untergang der Zelle bedeutet (Brown GC, 2002).

1.4.2. Das SOD2-Knock-Out-Mausmodell

Mit Hilfe von transgenen Techniken bzw. Gen-Silencing konnte die SOD2-Expression genetisch modifiziert werden, so dass eine Reihe verschiedener Tiermodelle mit SOD2-Defizienz existieren. Das Spektrum umfasst auch heterozygote SOD2-(SOD2^{+/-})-KO-Mausmodelle. Die kaum mehr überschaubare Fülle an Publikationen über die SOD2-KO-Maus belegt die Popularität des Modells für verschiedenste Gebiete. In folgenden Bereichen kommt das SOD2-KO-Modell zur Anwendung: Neurologie, Onkologie, Kardiologie, Hepatologie, Ophthalmologie, Pharmakologie/Medikamentensicherheit sowie Gerontologie (Lee YH, 2009). Das Modell wurde innerhalb der letzten zwei Dekaden phänotypisch, biochemisch und histologisch gut charakterisiert. Seit wenigen Jahren werden auch funktionelle Proteom-Studien an der SOD2-Maus durchgeführt. Diese geben einen Einblick in die - durch SOD2-Defizienz bedingten - komplexen biologischen Veränderungen (Lee YH, 2009). Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die wichtigsten in der Literatur publizierten Modelle. Die Tiermodelle für SOD2-Defizienz beruhen auf rekombinanten Deletionen oder Gen-Silencing (Boelsterli UA, 2008).

Tabelle 4: Zusammenschau der wichtigsten SOD2-Knock-Out-Modelle (modifiziert nach Boelsterli UA, 2008)

Maus-Modell	Referenz
<u>1. Maus Sod2 Gen KO, Sod2^{-/-tm1Leb}</u> C57BL/6x129 gemischter Hintergrund; Phänotyp: Mäuse sterben um den 21. postnatalen Tag	<i>Lebovitz RM, 1996</i>
<u>2. Maus Sod2 Gen KO, Sod2^{-/-tm1Cje}</u> (a) C57BL/6J Hintergrund; Phänotyp: fetale Form der dilatativen Kardiomyopathie, sterben um den 15. Tag nach Gestation in utero (b) DBA/2J Hintergrund; Phänotyp: metabolische Azidose, Mäuse sterben um den 8. Tag postnatal (c) F1 Mäuse von beiden Hintergründen; Phänotyp: Mäuse überleben drei Wochen	<i>Li Y, 1995</i> <i>Li Y, 1995</i> <i>Li Y, 1995</i> <i>Lynn S, 2005</i>
<u>3. Mäuse (C57BL/6CrSlc) gewebespezifischer (Leber) KO</u> via konditionalem KO-Allel über Cre-loxP rekombinantes System; Phänotyp: keine offensichtlichen morphologischen oder biochemischen Veränderungen in der Leber trotz der Deletion von Sod2	<i>Ikegami T, 2002</i>
<u>4. Mäuse (C57BL/6 x 129/Ola) gewebespezifischer (Epidermis) KO-Sod2^{+/-}</u> über Cre-loxP rekombinantes System; humanes Keratin 14 Promoter getriebene Cre Expression) Phänotyp: myokardialer Schaden, Schwellung der Mitochondrien, Lipidtropfen, Zeichen des oxidativen Stresses und der Apoptose im Herzen	<i>Strassburger M, 2005</i>
<u>5. Mäuse Knock-Down für Sod2 in C57BL/6J</u> via Pol2-exprimierter shRNA ; Phänotyp: langsames Wachstum, Fettleber, dilatative Kardiomyopathie, vorzeitiger Tod	<i>Xia XG, 2006</i>
<u>6. Heterozygoter Sod2 Gen KO, SOD2^{+/-}</u> unterschiedliche Hintergründe; Phänotyp: 50% der Wildtyp SOD Aktivität; weitestgehend normal (normales Körpergewicht, normale GSPx-, Katalase-, GSH- und GSSG-Levels); vermindertes $\Delta\Psi_m$, reduzierte Komplex-I- und Aconitase-Aktivitäten; Verminderung in state 3 der Atmung; erhöhte basale Levels an carbonylierten Proteinen im mt Proteinen und 8-OHdG in der mtDNA; erhöhte Sensitivität gegenüber mPT-induzierenden Agenzien	<i>Huang TT, 1999;</i> <i>VanRemmen H, 1999,</i> <i>2001, 2003; Kokoska</i> <i>JE, 2001; Williams</i> <i>MD, 1998; Ong MM</i> <i>2006, 2007; Lee YH,</i> <i>2008</i>

1.4.5.1. SOD2^{-/-}-Knock-Out-Mäuse

Die Mäuse weisen z. T. - beschränkt auf bestimmte Gewebe - einen selektiven Mangel an SOD2-Enzym auf (*Ikegami K, 2002; Qui X, 2003; Strassburger M, 2005*), z.T. wurde die SOD2-Aktivität auf der Basis unterschiedlicher genetischer Hintergründe auch systemisch ausgeschaltet (*Li Y, 1995; Lebovitz RM, 1996*). Ebenso vielfältig wie das genotypische Spektrum sind auch die phänotypischen Ausprägungen dieser Mäuse. Diese umfassen neonatale bzw. embryonale Letalität (*Li Y, 1995; Lebovitz RM, 1996; Huang TT, 2001*), Kardiomyopathie (*Li Y, 1995; Huang TT, 2001*), hämolytische Anämie (*Friedmann JS, 2001,2004*), epileptische Anfälle (*Huang TT, 2001; Liang LP, 2004b*), erhöhte Inzidenz für Neoplasien (*VanRemmen H, 2003*), genomische Instabilität (*Samper E, 2003*), mitochondriale biochemische Effekte (*Li Y, 1995; Lebovitz RM, 1996; Melov S, 1999; Hinerfeld D, 2004*), spongioforme Enzephalopathie (*Melov S, 1998*), optische Neuropathie (*Qi X, 2003*), Bewegungsstörungen (*Lebovitz RM, 1996, Melov S, 1998; Huang TT, 2001*) und Neurodegeneration (*Lebovitz RM, 1996; Hinerfeld D, 2004*). Die genannten Merkmale können als Produkte des endogenen oxidativen Stresses aufgefasst werden.

Verschiedene therapeutische Interventionen belegen eindrucksvoll die Wirksamkeit antioxidativer Substanzen (*Melov S, 1998, 2001; Hinerfeld D, 2004*). So konnte beispielsweise durch die Gabe eines SOD2-Mimetikums der Kardiomyopathie vorgebeugt werden und die Lebensspanne verlängert werden (*Melov S, 1998, 2001*). In anderen Therapiestudien konnte die Anämie reduziert werden (*Friedmann JS, 2001*) bzw. die mitochondriale Enzymaktivität gesteigert werden bei Reduktion der Neurodegeneration bzw. die für mitochondrial vermittelte spongioforme Enzephalopathien charakteristische Genexpression abgeschwächt werden (*Hinerfeld D, 2004; Golden TR, 2005*).

Bei sämtlichen SOD2-KO-Modellen ist die Lebensspanne der homozygoten Mutanten drastisch reduziert. Interessanterweise bewegt sie sich je nach genetischem Hintergrund innerhalb einer relativ großen Spannweite von drei bis 20 Tagen. Deshalb wurde schon seit längerem über die Existenz genetischer Modifikatoren gemutmaßt, die in der Lage sind den Grad des mitochondrialen oxidativen Schadens, bedingt durch die SOD2-Defizienz, zu modifizieren und damit Einfluss auf die Langlebigkeit zu nehmen (*Huang TT, 2001*).

In einer jüngeren Arbeit konnte mittels Quantitative-Trait-Locus-(QTL)-Untersuchungen ein entsprechender genetischer Modifikator für eine Verkürzung der Lebensdauer gefunden werden. In SOD2-defiziente Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund ließ sich ein Defekt im Nnt-Gen bei gleichzeitigem Fehlen eines funktionstüchtigen NNT-Proteins nachweisen (*Huang TT, 2006*). Bei NNT handelt es sich um ein nukleär-codiertes Protein der inneren Mitochondrienmembran, das für die Koppelung von NADPH-Produktion an den Protonentransport verantwortlich ist und in den Mitochondrien für die Regeneration zweier wichtiger antioxidativer Komponenten, Glutathion und Thioredoxin, sorgt. Wurde diese Region bei den C57BL/6J Mäusen durch einen entsprechenden QTL der DBA/2J Mäuse ersetzt, verlängerte sich die Lebensspanne der C57BL/6J-Mäuse entsprechend der höheren Lebenserwartung der DBA/2J Mäuse. Die genannten Funktionen des NNT-Proteins können möglicherweise seine mutmaßliche schützende Rolle in SOD2-defizienten Mäusen erklären (*Huang TT, 2006*).

1.4.5.2. SOD2^{+/-}-Knock-Out-Mäuse

Diese Mäuse sind milderem mitochondrialen Stress unterworfen, so dass sie in der Regel einen intermediären bis normalen Phänotyp aufweisen (*Boelsterli UA, 2008*).

Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle das Ergebnis einer Arbeit, in der ein neuer (heterozygoter) Genotyp kreiert wurde, der neue phänotypische Auffälligkeiten bietet. Während in der initialen SOD2^{+/-}-Maus keine ultrastrukturellen mitochondrialen Auffälligkeiten

nachgewiesen werden konnten, zeigte sich bei der SOD2^{+/-}-Maus mit gemischtem genetischen Hintergrund geschwollene und aufgerissene Mitochondrien sowie eine Akkumulation von Lipidtropfen, gesteigerte Nitrotyrosininformationen, Lipidperoxidationen sowie eine Aktivierung von Apoptose-Signalwegen (*Strassburger M, 2005*). Dieses Beispiel bestätigt die These der genetischen Modifikation und belegt außerdem die Schlüsselrolle der Mitochondrien in der Entscheidung über Leben und Tod.

Die Lebensspanne ist im Vergleich zu Wildtypen bei heterozygoten SOD2-Mäusen nicht wesentlich vermindert. Dementsprechend sind sie in der Forschung beliebtes Studienobjekt für klinisch stumme mitochondriale Abnormalitäten (*Boelsterli UA, 2008*).

Mutante SOD2^{+/-}-Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtypen ein ähnliches Körpergewicht und Größenwachstum auf. Außerdem zeigten sie in diversen Organen identische GSH/GSSG-, Gluthationperoxidase-, Katalase- und SOD1-Levels. Lediglich im Muskel zeigte sich für SOD1 eine kompensatorische Hochregulation (*Boelsterli UA, 2008*).

Andererseits konnte in diesen Tieren auch erhöhter mitochondrialer oxidativer Stress nachgewiesen werden, der mit altersabgängigem mitochondrialen Funktionsverlust einherging. Des Weiteren konnte in den heterozygoten Tieren eine verminderte Aconitase-Aktivität, erhöhte Proteincarbonyllevels und eine Verminderung der RCR nachgewiesen werden (*Boelsterli UA, 2008*). Sämtliche Befunde können als Indiz für mitochondrialen Funktionsverlust bei erhöhtem oxidativen Stress gewertet werden.

1.4.5.3. Das SOD2^{-/-tmLeb}-Mausmodell

Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf das SOD2^{-/-tmLeb}-Mausmodell, das auch für die eigenen Experimente eingesetzt wurde.

Das Mausmodell basiert auf einer zielgerichteten Mutation des SOD2-Gens. Hierfür wurde ein 1,5 Kb Hind3 Fragment, das Exon 1 und 2 des SOD2-Gens, sowie weitere ca. 500Bp im Anschluss an das 5'-Ende des Exon 1 beinhaltete, durch ein humanes Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-Minigen, das über einen Phosphoglyceratkinase-Promoter gesteuert wird, ersetzt. Durch diese Deletion konnte sowohl der Ort der Transkriptions- bzw. Translationsinitiation als auch die mitochondriale Zielsequenz sowie eines der drei Histidine, die direkt an den Mangan-Cofaktor binden, eliminiert werden. Die SOD-tm1Leb Mutation wurde mehr als fünfmal mit C57BL/6 Mäusen zurückgekreuzt (*Lebovitz RM, 1996*).

Die Sensation des Modells bestand v.a. darin, dass die homozygoten Mutanten bis zu drei Wochen überlebten und in der Beobachtung diverser neuartiger Phänotypen (*Lebovitz RM, 1996*). Bei anderen bis dato beschriebene Modellen verstarben die homozygoten Mutanten innerhalb der ersten fünf Tage postnatal mit schwerer Kardiomyopathie ohne Anzeichen von Bewegungsstörungen, ZNS-Schaden oder ultrastrukturellen Hinweise auf mitochondrialen Schaden (*Li Y, 1995*).

Phänotypisch wiesen die homozygoten Mutanten schwere Anämie, Degeneration von Neuronen in Basalganglien bzw. im Hirnstamm, progrediente Bewegungsstörungen mit Schwäche, schneller Ermüdbarkeit und Koordinationsschwierigkeiten auf. Zusätzlich zeigten Mäuse älter als sieben Tage ausgeprägten mitochondrialen Schaden innerhalb degenerierter Neurone und kardialer Myozyten. Zusätzlich wiesen annähernd 10% der homozygoten Mutanten deutlich vergrößerte und dilatierte Herzen auf (*Lebovitz RM, 1996*).

Ursächlich dürfte an den Veränderungen die verzögerte Wachstumsentwicklung und Reifung der Mutanten im Vergleich zu den Heterozygoten und Wildtypen beteiligt sein. Während die homozygoten Mutanten ihren Wurfgeschwistern hinsichtlich des Wachstums nachstanden, konnte kein Unterschied in der Entwicklung zwischen heterozygoten Mutanten und Wildtypen festgestellt werden (*Lebovitz RM, 1996*).

Die beschriebenen Beobachtungen können als Indizien für eine erhöhte Suszeptibilität metabolisch aktiver Gewebe (ZNS, Kardiomyozyten u.a.) gegenüber oxidativem mitochondrialen Schaden nach postnataler Exposition erhöhter O₂-Konzentrationen gewertet werden. Die Tatsache, dass das Verhältnis zwischen homozygoten Mutanten, heterozygoten Mutanten und Wildtypen innerhalb eines Wurfes annähernd dem nach den Mendelschen Regeln zu erwarteten Verhältnis 1:2:1 entsprach, schließt eine embryonale Letalität der SOD2-Defizienz nahezu aus (*Lebovitz RM, 1996*). Mögliche Erklärung für die ungestörte embryonale Entwicklung ist ein protektiver Effekt der Kombination aus niedriger O₂-Spannung und einem oxidativen Metabolismus auf relativ niedrigem Niveau. Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass in utero bei Nagetieren und Primaten die SOD2-Levels bis relativ spät in der Schwangerschaft sehr niedrig sind (*Allen RG, 1991; Frank L, 1991*). Zudem deutet der Nachweis einer gesteigerten SOD1-Aktivität in ca. 25% der homozygoten Mutanten auf kompensatorische Regulationsmechanismen hin (*Lebovitz RM, 1996*).

Histologisch imponierte bei den Mutanten hypozelluläres Knochenmark mit einer Verminderung sämtlicher hämatopoetischer Zelllinien, ein atypisches Muster an Glykogenablagerungen in Hepatozyten und degenerativer Schaden an ZNS-Neuronen mit besonderer Betonung der Basalganglien bzw. des Hirnstamms; Kortex und Rückenmark waren kaum betroffen. Charakteristika des neuronalen Schadens waren mitochondriale Beeinträchtigungen, Polysomenverluste und die Räumung des Zytoplasmas. Des Weiteren wurde eine relative Abwesenheit des rauen endoplasmatischen Retikulums, eine fokale Dilatation des glatten endoplasmatischen Retikulums und eine Kräuselung der nukleären Membran beobachtet. Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu den beschädigten Neuronen waren für gewöhnlich morphologisch unauffällig. In Gehirnen von Kontrollen (Wildtypen und Heterozygote) konnten trotz extensiver Suche keine entsprechenden degenerierten Neurone gefunden werden (*Lebovitz RM, 1996*).

Bei Mutanten mit Kardiomyopathie (ca. 10%) fanden sich im Myokard Anzeichen für fokalen Zelltod mit geschwollenen, geschädigten Mitochondrien und einer Fülle an Lipid-gefüllten Vakuolen. In besonders stark geschädigten Regionen konnten zudem degenerative mitochondriale Veränderungen mit diffusem, elektronendichten Ablagerungen nachgewiesen werden. Vermutlich sind diese Ablagerungen strukturelles Korrelat der Lipidperoxidation von mitochondrialen Membranen. In Myozyten von Tieren ohne extreme kardiale Dilatation konnte eine gesteigerte Akkumulation von Neutrallipiden nachgewiesen werden, aber ultrastrukturell fanden sich keine Zeichen einer mitochondrialen Schädigung (*Lebovitz RM, 1996*).

Insgesamt fällt auf, dass SOD2-Defizienz selektiv mitochondrialen Schaden in Zellen mit obligaten hohen Energiebedarf und damit einem oxidativen Metabolismus auf hohem Niveau, anrichtet. Außerdem ist hervorzuheben, dass die erwähnten Veränderungen (Neurodegeneration, Anämie etc.) einen progredienten Verlauf aufweisen; ergänzend dazu sei erwähnt, dass sich bestimmte Veränderungen ultrastrukturell erst nach einer gewissen Zeit postnatal nachweisen ließen (*Lebovitz RM, 1996*).

Beide Aspekte stehen im Einklang mit dem Postulat der mitochondrialen Theorie des Alterns. Supportiv für die These einer Akkumulation kann die Beobachtung an SOD2-KO-Mäusen mit -tmCje-Mutation (dieses Modell ist durch frühen postnatalen Tod gekennzeichnet) herangezogen werden (*Li Y, 1998*): Die Gabe des nicht-hirngängigen SOD2-Mimetikums Mangan-Tetrakis-5,10,15,20-Benzoesäure-Porphyrin (MnTBAP) verhinderte die Entwicklung der sonst obligaten systemischen Pathologien und verlängerte die Überlebenszeit der Mäuse drastisch. Stattdessen entwickelten sie ab dem Alter von drei Wochen einen für den genetischen Hintergrund neuen, neurologischen Phänotyp mit progressiver Bewegungsstörung und Debilität (*Melov S, 1998*). Offenbar ist es eine Frage der Zeit, bis ein gewisses Maß an Schäden im Sinne eines Schwellenwertes erreicht ist und diese klinisch manifest werden.

Nachdem MnTBAP nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, liegt der Schluss nahe, dass die ZNS-Veränderungen durch exzessive mitochondriale ROS-Produktion hervorgerufen

wurden (*Melov S, 1998*). Darüber hinaus indiziert das Beispiel, dass die neurologischen Veränderungen an SOD2-KO-Mäusen a priori auf die SOD2-Defizienz und nicht auf den genetischen Hintergrund der Mutation zurückzuführen sind.

Den Beweis für die Wirksamkeit einer effizienten ROS-Elimination lieferte die selbe Gruppe, in dem sie zeigen konnten, dass nach Gabe von hirngängigen SOD2-/Katalase-Mimetika die Lebensspanne der Tiere verdreifacht werden konnte und die initial beobachtete spongioforme Enzephalopathie nicht mehr auftrat. Außerdem wurde eine Abschwächung der mitochondrialen Defekte beobachtet (*Melov S, 2001*).

2. Eigene Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Seit langem wird über eine Beteiligung der Mitochondrien am physiologischen Alterungsprozess gemutmaßt. Dafür spricht u.a. die Erkenntnis, dass in postmitotischen Zellen Deletionen der mtDNA akkumulieren (*Corral-Debrinski M, 1992*). Mitglieder der Arbeitsgruppe „Mitochondriale Neurogenetik“ konnten auf Einzelzellebene zeigen, dass der Deletionsgrad sowohl im Rahmen des Alterungsprozesses als auch im Rahmen bestimmter neurodegenerativer Erkrankungen deutlich höher liegt als bisher angenommen (*Bender A., 2006*). Maßgeblich verantwortlich dürften hierfür „Verwässerungseffekte“ bei der Untersuchung von Gewebehomogenaten sein. Über Kausalzusammenhänge zwischen Alter bzw. neurodegenerativen Erkrankungen und der Deletionsakkumulation kann bisher nur spekuliert werden (*Baron M., 2007*). Auffallend ist dabei die besondere Vulnerabilität dopaminerger Neurone v.a. in der SN (*Andreassen OA, 2002; Liang LP, 2004a; Bender A., 2006*). Der selektive Neuronenverlust spielt einerseits die entscheidende Rolle in der Pathogenese des PD. Andererseits konnten ausgerechnet in diesen Neuronen besonders hohe Deletionsgrade gemessen werden (*Bender A., 2006; 2008*). Bestimmte Eigenschaften dopaminerger Neurone lassen vermuten, dass oxidativer Stress maßgeblich an der Entstehung von Δ mtDNA beteiligt ist. Details hierzu wurden bereits unter 1.1. ausgeführt. Des Weiteren begünstigen offenbar auch Störungen nukleär codierter Proteine, die für Reparatur und Replikation der mtDNA verantwortlich sind, die Akkumulation von Δ mtDNA (*Trifunovic A., 2004; Vermulst M., 2008*). Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Kausalitätsnachweis zwischen oxidativem Stress und Δ mtDNA. Als Modell hierfür wurde die SOD2-KO-Maus gewählt. Das Tiermodell zeichnet sich durch hohen endogenen mitochondrialen oxidativen Stress aus, so dass es auf einen möglichen Kausalzusammenhang von oxidativen Stress im Sinne toxischer Sauerstoffverbindungen („freie Radikale“) und Δ mtDNA untersucht werden konnte. Neben der Untersuchung von Gewebehomogenat wurde dabei ein besonderes Augenmerk auf Einzelzelluntersuchungen gelegt, um den oben erwähnten „Verwässerungseffekt“ auszuschalten. Folgende Aspekte wurden vor diesem Hintergrund am SOD2-KO-Mausmodell in der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. Führt oxidativer Stress dosisabhängig zu Δ mtDNA in Hirn, Muskel, Leber und Herz?
2. Beeinflusst oxidativer Stress die Kopienanzahl der mtDNA?
3. Ändern sich die Auswirkungen des oxidativen Stresses im Lebenslauf der Mäuse?
4. Zeigt sich eine besondere Vulnerabilität dopaminerger Neurone der SN?

Aus diesen Zielsetzungen ergab sich folgendes methodisches Arbeitsprogramm:

1. Gruppeneinteilung nach Genotyp:

Genotypisierung aus Tail-DNA mit Hilfe der quantitativen *realtime PCR*

2. Probengewinnung:

Sektion der Tiere und **Präparation** der Organe von Neugeborenen und einjährigen Tieren

2.1. Untersuchungen der Proben von Neugeborenen:

(A) Untersuchungen auf Homogenatsebene

- **DNA-Extraktion** aus Gehirn, Herz, Leber und Muskel
- **Realtime PCR** zur **quantitativen** Bestimmung von **Deletionen** und **Kopienanzahl** in Gewebhomogenaten
- **Nested long PCR** zur **qualitativen** Darstellung von **Deletionen**
- **8-OHdG Quantifizierung** mittels **ELISA** (Nachweis der oxidativen Schädigung)

(B) Untersuchungen auf Einzelzelebene

- Anfertigung von **histologischen Präparaten** aus Maushirn
- Identifikation der dopaminergen Neurone mit Hilfe der **immunhistochemischen Anti-Tyrosinhydroxylase-Färbung** (Tyrosinhydroxylase stellt Schlüsselenzym im Dopaminstoffwechsel dar)
- **Selektion** der **TH positiven Neurone** mit Hilfe der **Lasermikrodissektion**
- **Isolierung** der **DNA** mit **Micro-Extraktionskit**
- Untersuchung der so gewonnen DNA auf **Deletionen** im mitochondrialen Genom
- **Qualitative** Darstellung von **Deletionen** mittels **nested long PCR**
- **Quantitative** Darstellung von **Deletionen** mittels **realtime PCR**

2. Wiederholung der Deletions- bzw. Kopienanzahlsuntersuchungen bei älteren Tieren (12 Monate):

Zeitliche Dynamik der Deletionsbelastung:

- Nachweis einer **Akkumulation von Deletionen/Mutationen** im Sinne von „Life lesions“ gemäß der „Mitochondrialen Theorie des Alterns“ durch Untersuchung von einjährigen Tieren

Zeitliche Dynamik der relativen Kopienanzahl

- Nachweis reaktiver Veränderungen im Sinne einer Erhöhung oder Erniedrigung der relativen Kopienanzahl

3. Material und Methoden

3.1. Tiere und Tierhaltung

Bei den Tieren handelt es sich um SOD2-KO-Mäuse vom Typ B6.129S7-Sod2^{tm1Leb}/J mit C57BL/6J Hintergrund. Diese Tiere sind kommerziell erhältlich. Das Mausmodell basiert auf einer Arbeit von Russell M. Lebovitz (*Lebovitz RM, 1996*). Die Tiere waren zum Zeitpunkt des Erwerbes nach fünfmaliger Rückkreuzung in der 15. Tochtergeneration und schließlich einmal erneut rückgekreuzt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils Heterozygote miteinander verpaart.

Die Mäuse wurden in der German Mouse Klinik des Helmholtz-Zentrum (ehemals GSF) in isoliert belüfteten Typ 2 Käfigen mit Sägespänen als Einstreu bei einer Temperatur von 20 bis 24°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%, einem 20fachen Luftaustausch pro Stunde und bei einem 12/12-Stunden Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Gemäß den FELASA-Richtlinien wurden die Inzucht-Mäuse alle zwölf Wochen auf Mikroorganismen getestet. Sowohl Tierhaltung als auch durchgeführte Prozeduren erfolgten im Einklang mit den Richtlinien für Tierhaltung und dem am Helmholtz-Zentrum üblichen Umgang mit Tieren sowie unter Berücksichtigung der deutschen Rechtsprechung.

3.1.1. Tiere

Die Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen aus verschiedenen Gewebekomponenten wurden einerseits an 14 (Gehirn) bzw. 26 (Herz) Neugeborenen durchgeführt, andererseits auch an 21 einjährigen Mäusen. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung auf Deletionen aus der DNA einzelner SN-Neuronen. Bei den Neugeborenen wurden Wildtypen, Heterozygote und Knock-outs miteinander verglichen, bei den einjährigen Mäusen wurden Wildtypen mit Heterozygoten verglichen (Anm.: Knock-Outs überleben nur wenige Wochen).

Tabelle 5: Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen Neugeborener aus Herzwirkstoffkomponente

Anzahl	Genotyp
12	Wildtypen
7	Heterozygote
7	Knock-Outs
26	Summe

Tabelle 6: Kopienanzahls- bzw. Deletionsuntersuchungen aus Gehirnwirkstoffkomponente

Anzahl	Genotyp
5	Wildtypen
5	Heterozygote
4	Knock-Outs
14	Summe

Tabelle 7: Einjährige Tiere für Kopienanzahls- bzw Deletionsuntersuchungen aus diversen Gewebekomogenaten (Wildtypen)

Nr.	Alter (Tage)	Genotyp
1	360	Wildtyp
2	360	Wildtyp
3	382	Wildtyp
4	332	Wildtyp
5	143	Wildtyp
6	221	Wildtyp
7	242	Wildtyp
<i>Mittelwert</i>	291,4	
<i>Standardabweichung</i>	98,0	

Tabelle 8: Einjährige Tiere für Kopienanzahls- bzw Deletionsuntersuchungen aus diversen Gewebekomogenaten (Heterozygote)

Nr.	Alter (Tage)	Genotyp
1	260	Heterozygot
2	260	Heterozygot
3	426	Heterozygot
4	426	Heterozygot
5	426	Heterozygot
6	426	Heterozygot
7	361	Heterozygot
8	382	Heterozygot
9	362	Heterozygot
10	332	Heterozygot
11	143	Heterozygot
12	156	Heterozygot
13	138	Heterozygot
14	138	Heterozygot
<i>Mittelwert</i>	302,6	
<i>Standardabweichung</i>	117,6	

Tiere	Produktnummer	Hersteller
B6.129S7- Sod2 ^{tm1Leb} /J	002973	The Jackson Laboratory

3.1.2. Ernährung

Die Ernährung der Tiere erfolgte ad libitum mit einem standardisierten Futter (1314, Altromin) und Wasser.

3.1.3. Tötungskriterien und standardisierte Tötung

Kriterien für eine außerplanmäßige Tötung waren offensichtliche Anzeichen von Krankheit, die in Widerspruch zu den Tierhaltungsrichtlinien standen:

- Eingeschränktes Bewegungsvermögen
- Schnelle oder flache Atmung
- Zerzaustes Fell
- Deutliche Abmagerung
- Diarrhoe
- Ulzerierende Dermatitis oder andere Hautläsionen größer als 1 cm²
- Starke Gewichtsverluste oder Neoplasien

Die kontrollierte Tötung erfolgte mittels CO₂-Euthanasie.

3.2. Genotypisierung aus Tail-DNA mittels realtime PCR

Die Genotypisierung zur Gruppeneinteilung erfolgte aus Tail-DNA mittels realtime PCR.

3.2.1. Grundprinzipien der realtimePCR

Gegenüber der herkömmlichen PCR zeichnet sich die realtime PCR durch die zusätzlich Möglichkeit der Quantifizierung von Genprodukten aus. Die Quantifizierung erfolgt auf der Grundlage von Fluoreszenzmessungen. In Abgrenzung zur kompetitiven PCR, die ebenso quantitativ ist, ist die Messung bereits ab dem ersten Zyklus möglich, so dass die Methode den Verlauf der Reaktionen „in Echtzeit“ widerspiegelt.

Zusätzlich zu den Forward bzw. Reverse Primern ist eine so genannte sequenzspezifische „Probe“ im Reaktionsgemisch vorhanden, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist, die aneinander gebunden vorliegen. Die Probe bindet zwischen den zwei Primern an die Gensequenz.

Zunächst emittiert nur einer der Farbstoffe Licht („Quencher“), durch Energietransfer auf den Quencher wird der 2. Farbstoff gehemmt. Die Primer werden durch die Taq-Polymerase solange verlängert, bis sie auf die Probe treffen. Jetzt wird die Probe vom Strang gelöst und durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut.

Die Trennung der Farbstoffe bewirkt eine Lichtemission des anderen Farbstoffs („Reporter“), diese kann gemessen werden. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Fluoreszenz und Menge der PCR-Produkte, so dass auch die PCR-Produkte quantitativ bestimmt werden können. Die Messung der Reporterfluoreszenz erfolgt alle 7 Sekunden. Damit kann der Verlauf der PCR-Reaktion kontinuierlich verfolgt werden.

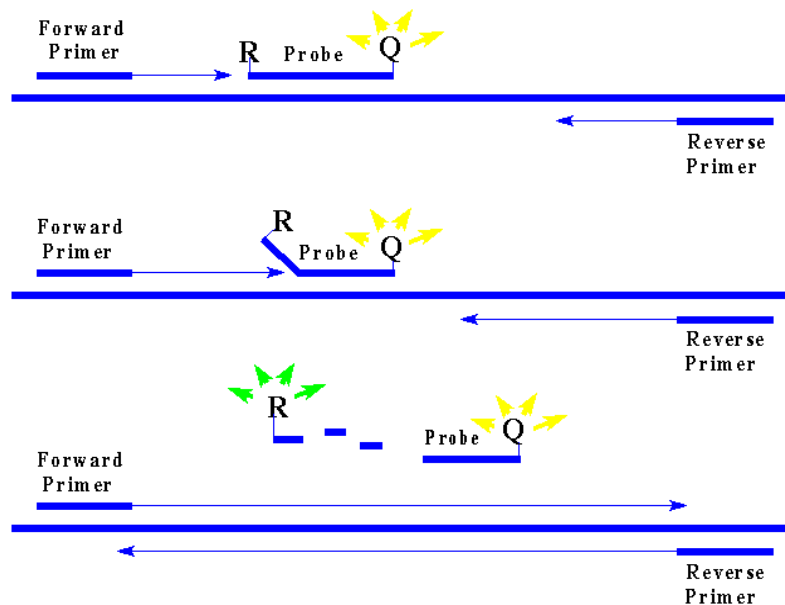


Abbildung 4: Prinzip der Fluoreszenzmessung während der realtime PCR (Applied Biosystems)

D.h. die realtime PCR zeichnet sich durch die Möglichkeit der Quantifizierung ohne aufwendige Gelaufentrennung der PCR-Produkte aus, so dass für die Auswertung das Kontaminationsrisiko deutlich verringert ist.

Prinzipiell werden für die realtime PCR folgende Reagenzien benötigt: Forward und Reverse Primer, sequenzspezifische Probe mit Fluoreszenzfarbstoff, sogenannter „Gene Expression Assay“, hochreines Wasser sowie das Template.

Die realtime PCR setzt sich aus drei Phasen zusammen, wobei nur in der 2. Phase der Amplifikation quantifiziert werden kann.

- 1. Phase: Die Templatemenge ist begrenzt, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass Template, Primer und Polymerase aufeinandertreffen ist suboptimal.
- 2. Phase: Nur hier kommt es zum exponentiellen und damit quantifizierbaren Anstieg. Die Messung beginnt am „Treshhold Cycle“ (=Ct-Wert). Parallel dazu ist der „Crossing Point“ (=CP-Wert) definiert als der Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt
- 3. Phase: Der starke Anstieg von DNA, Pyrophosphat und Mononukleotiden führt zur Produkthemmung, zusätzlich kommt es zur Hybridisierung von Produktfragmenten, Substratverbrauch, Hitzedenaturierung.

Die Effizienz R^2 kann mit Hilfe der Steigung m einer Standardkurve berechnet werden.

$$R^2 = 10^{(-1/m)} - 1$$

Formel 3: Berechnung der Effizienz für realtime PCR

Bei Messung von zwei Genen (und komparativen Berechnungen) muss die Effizienz der Genmessungen annähernd gleich sein (Parallelität der Geraden). Im Optimalfall beträgt die Steigung -3,32. Das entspricht einer Effizienz von 1. Mathematisch betrachtet, besteht im Bereich dieses Wertes eine direkte Proportionalität zwischen Fluoreszenz und DNA-Ausgangsmenge.

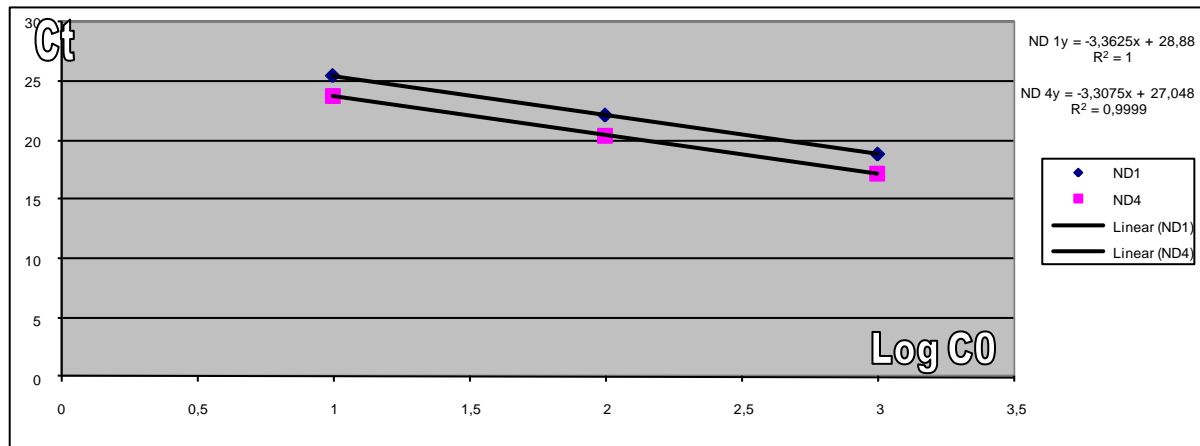


Abbildung 5: Standardkurve für real-time PCR (eigene Ergebnisse)

3.2.2. Grundlagen der Genotypisierung mittels real-time PCR

In den Tail-DNAs wurde sowohl das „Houskeeping“-Gen β -Aktin (ACTB) als auch das funktionstüchtige Wildtyp SOD2-Gen gemessen. Aus dem Verhältnis der zwei Gene zueinander in Relation zu einer Standard-DNA aus Blut kann der Genotyp über folgende Formel berechnet werden:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Tail-DNA}[Ct(\text{SOD2}) - Ct(\text{ACTB})] - \text{Standard}[Ct(\text{SOD2}) - Ct(\text{ACTB})]$$

Formel 4: Berechnung des Genotyps mittels realtime PCR Ergebnissen

Die Formel beruht auf der Tatsache, dass bei voller Integrität des Genoms (Standard-DNA), das Verhältnis der beiden nukleär codierten Gene ACTB und SOD2 stets 1:1 ist. Lediglich in genotypisch veränderten Tieren würde man einen Ausfall bzw. eine Verminderung der Menge des gemessenen Wildtyp SOD2 -Gens bei normalen ACTB-Werten erwarten.

Im Idealfall erhält man für Wildtypen den Wert 1, für heterozygote Mutanten den Wert 0,5 und für homozygote Mutanten den Wert 0. D.h. bei gleicher Menge des ACTB-Gens weisen Wildtypen die „volle“ (zwei Allele) Menge an Wildtyp SOD2-Gen auf, heterozygote die halbe Menge (ein Allel) und bei homozygoten Mutanten sind keine Wildtyp SOD2-Gene (kein Allel) messbar.

3.2.3. Praktisches Vorgehen

Zunächst wurde das benötigte Material (Pipetten, Pipettenspitzen, Röhrchen für Mastermixe, ddH₂O, 96er Well-PCR-Platte) für 30min mit UV-Licht bestrahlt, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren. Nach Ablauf der Zeit wurde der Mastermix für SOD2 bzw. ACTB entsprechend dem untenstehenden Protokoll zusammenpipettiert. Anschließend wurden jeweils 18 μ l der zwei Mastermixe in separate Wells einer 96er Well-Platte pipettiert. Von den Tail-DNAs wurden jeweils 2 μ l einmal in ein Well mit SOD2-Mastermix und einmal in ein Well mit

ACTB-Mastermix pipettiert. Pro Lauf wurde (in Duplikaten) auch Blut-DNA als Referenzgrundlage der Berechnung und eine Wasserprobe als Negativkontrolle verwendet.

Nach dem Pipettieren der Platte wurde dieser ein spezieller Schutzfilm aufgeklebt.

Sämtliche Schritte wurden unter der Hood mit Schutzhandschuhen durchgeführt, um ein möglichst sauberes Arbeiten zu gewährleisten.

Die fertig pipettierte Platte mit Schutzfilm wurde für 2min zentrifugiert, zum einen zur besseren Durchmischung, zum anderen um eventuelle randständig pipettierte Flüssigkeitstropfen in die Zentren der Reaktionsgefäße zu befördern. Anschließend wurde die Platte in das realtime Gerät eingelegt und die Anwendung entsprechend der untenstehenden Einstellungen gestartet. Um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen, wurde jede Probe in mindestens zwei separaten Läufen gemessen.

Die Rohdaten wurden in das Programm „Microsoft Excel“ zur Berechnung exportiert und anschließend wurden die berechneten Werte mittels „SPSS“ statistisch ausgewertet. Die durchgeführten statistischen Tests sind unter 3.4.1.2. aufgeführt.

Tabelle 9: Geräteeinstellungen für realtime PCR

Zyklen	Analysemodus	Zieltemperatur	Zeitdauer
Präinkubation			
1	Keiner	50°C	2min
1	Keiner	95°C	10min
Amplifikation			
40	Quantifizierung	95°C	15s
Kühlung			
1	Keiner	60°C	1min
1	Keiner	4°C	unbegrenzt

Tabelle 10: Protokoll für realtime PCR (SOD2-Assay)

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Reaktion (µl)
Gene Expression Assay	2x	10
Forward Primer (SOD2)	100µM	0,36
Reverse Primer (SOD2)	100µM	0,36
Probe	5x	1
ddH ₂ O		6,28
Template-DNA		2
<i>Totales Volumen pro Reaktion</i>		20

Tabelle 11: Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für realtime PCR (Genotypisierungsassay)

Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Hard- und Software	Produktbezeichnung / Katalognr.	Hersteller
TaqMan® Gene Expression Assay	4331182	Applied Biosystems, Germany
SOD2 Primer-Probe-Assay	Mn00449725_g1 (Assay-ID) NM_013671.3 (RefSeq)	Applied Biosystems, Germany
ACTB Primer-Probe-Assay	Mouse ACTB Endogenous Control, 4352933E	Applied Biosystems, Germany
Micro Amp Fast optical 96-Well	4346906	Applied Biosystems, Germany
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG
Step One™ Real-Time-PCR Systems	4376374	Applied Biosystems, Germany
Personal-Computer	Satellite A100-512	Toshiba
Microsoft Excel	Excel 2003	Microsoft
SPSS Softwarepaket 12.0	SPSS Softwarepaket 12.0	SPSS Corp
R Development Core Team Version 2.12.0	ISBN 3-900051-07-0, URL	R Foundation for Statistical Computing, Vienna/Austria

3.3. Probengewinnung

3.3.1. Organentnahme und Konservierung

Nach der Sektion der Tiere wurden Gehirn, Herz, Muskel und Leber präpariert. Die entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die anstehenden Untersuchungen bei -80°C kryokonserviert. Die Gehirne wurden zusätzlich für die unterschiedlichen Experimente nach folgendem Schema geteilt:

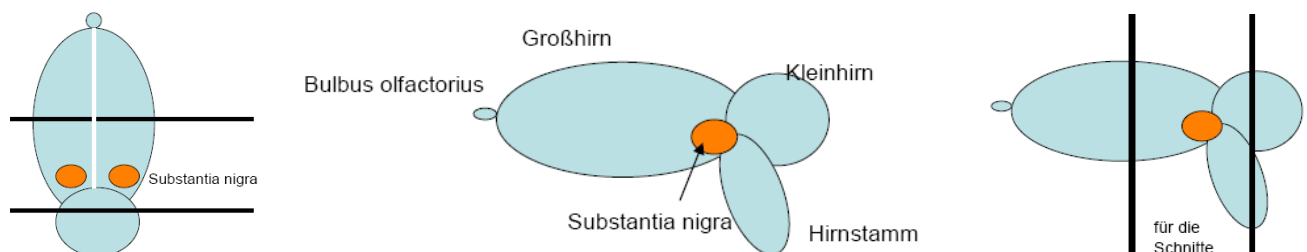


Abbildung 6: Teilungsschemata der Maushirne

Der SN-haltige Mittelteil wurde für die histologischen Präparate reserviert. Die verbleibenden zwei Teile wurden für DNA-Extraktion und 8-OHdG-ELISA aufbewahrt.

Die 8-OHdG-Bestimmung mittels ELISA wurde von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe durchgeführt. Deshalb wird das Ergebnis der Untersuchung lediglich unter 4.1. aufgeführt.

3.3.2. DNA-Extraktion aus Gewebehomogenat

Zunächst wurde von den kryofixierten Organen (Gehirn, Herz, Leber, Muskel) bei -20°C ein ca. 2mm³ Gewebestück seziiert. Nach der Homogenisierung des Gewebes wurde die DNA mit Hilfe eines speziellen Kits (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Germany) nach dem Protokoll des Herstellers [„Purification of total DNA from Animal Tissues (Spin-Column-Protocol)“] extrahiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe eines Photospektrometers (NanoDrop ND 1000, Peqlab, Germany) bestimmt und unter Zugabe von bestimmten Mengen an hochreinem Wasser auf eine Konzentration von 10ng/μl äquilibriert. Die DNA-Extraktion erfasste sowohl nDNA als auch mtDNA. Dies ist insofern von Bedeutung, da mittels realtime PCR sowohl mitochondriale Gene (zur Deletionsbestimmung) als auch ein nukleäres Referenzgen (zur Kopienanzahlbestimmung) gemessen wurden.

Tabelle 12: Reagenzien und Gerätschaften für DNA-Extraktion aus Gewebehomogenaten

Reagenzien/Gerätschaften	Produktbezeichnung/Katalognummer	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	69504	QiagenGmbH, Hilden (D)
NanoDrop ND 1000	C434	Peqlab, Germany
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG

3.3.3. Anfertigung histologischer Präparate aus Maushirn

Die bei -80°C kryokonservierten Gehirne wurden zunächst für eine Stunde bei -20°C gelagert. Anschließend wurden sie entsprechend der Abbildung 7 aufgetaut. Mittels Kryostat wurden 10μm dünne anterior-posterior gerichtete Koronarschnitte im Bereich der SN angefertigt. Nachdem die SN der Maus (im Gegensatz zur humanen SN) nicht das schwarze Pigment Melanin aufweist, ist sie makroskopisch im Nativpräparat nicht sichtbar. Dementsprechend erfolgte die Orientierung unter Zuhilfenahme eines anatomischen Schnittbildmausatlasses an Landmarken, wie dem Ventrikelsystem oder der Hippocampusfissur, die auch im Nativpräparat identifizierbar sind. Pro Objektträger wurden mehrere Schnitte aus weiter auseinanderliegenden Bereichen (also keine Folgeschnitte) aufgenommen, um die Chance zu erhöhen, dass die SN auf einem der Schnitte enthalten ist. Als Objektträger wurden spezielle, für die Lasermikrodissektion erforderliche PEN-Membranen, verwendet (Leica, Germany) und diese bis zu den weiteren Prozeduren bei -80°C tiefgefroren.

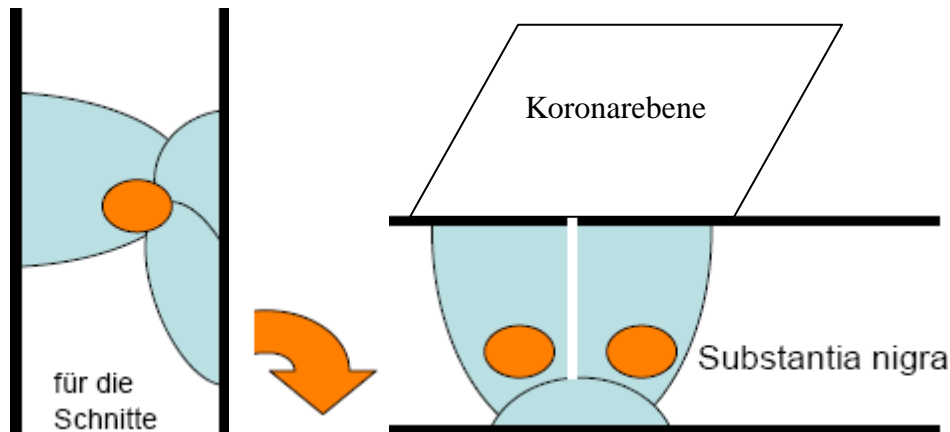


Abbildung 7: Schemata zur Anfertigung von Gewebeschnitten aus Maushirn

Tabelle 13: Verbrauchsmaterial und Gerätschaften für die Anfertigung histologischer Präparate

Verbrauchsmaterial/Gerätschaften	Produktbezeichnung/Katalognummer	Hersteller
Leica Membran Slides PEN-Membran 2,0µm	11505158	Micro Dissect GmbH (Herborn)
Kryostat	Mikrom	Walldorf

3.3.3.1. Identifikation dopaminerger Neurone mittels Anti-TH-Färbung

3.3.3.1.1. Grundlagen der Anti-Tyrosinydroxylase-Färbung

Bei der Tyrosinhydroxylase-(TH)-Färbung handelt es sich um eine immunhistochemische Färbung, die mit Hilfe der Zugabe eines entsprechenden Antikörpers (Anti-TH) das Protein Tyrosinhydroxylase (Antigen) sichtbar machen kann. Die Tyrosinhydroxylase stellt das Schlüsselenzym im Dopaminstoffwechsel dar, d.h. sie ist ein Marker für dopaminerge Neurone.

3.3.3.1.2. Praktisches Vorgehen

Die kryokonservierten Schnitte wurden zunächst für 30min bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden sie für 5min in eiskaltem Aceton fixiert. Nach einer Trockenzeit von 10min wurden die Objektträger für dreimal eine Minute in PBST gewaschen. Nächster Schritt war das Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität mit dem „Peroxidase-Blocking“-Reagenz eines entsprechenden Kits (Chemicon KIT 2762). Nach einem erneuten Waschschritt wurde die so genannte „Blocking Solution“ bestehend aus PBST, 10% Goat-Serum und 1% BSA zur Minderung von unspezifischer Bindung aufgetragen. Nach 30min wurde die Lösung lediglich abgekippt und die Schnitte mit dem Rabbit Anti-TH-Antikörper

(Chemicon, AB152) bedeckt. Der Antikörper wurde mit PBST unter dem Zusatz von 1% Goat-Serum und 1% BSA auf 1:100 verdünnt. Inkubiert wurde bei 37°C für eine Stunde. Nach erneutem Waschschrift wurde zur Detektion des primären Antikörpers das gebrauchsfertige „Anti-Mouse Poly HRP“ (Chemicon) für 30min aufgetragen. Nach erneutem Waschschrift wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers ein Gemisch aus DAB Chromogen und DAB-Puffer im Verhältnis 1:40 gemischt und für fünf Minuten aufgetragen. Nach erneutem Waschschrift wurden die Schnitte zum Dehydrieren zehnmal in 100% Ethanol getaucht, dann für 20min bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

Sämtliche Schritte der Anti-TH-Färbung konnten dahingehend optimiert werden, dass eine eindeutige Identifikation der SN sowie der dopaminergen Neurone möglich war.

Bereits makroskopisch war die SN als farbiges Areal auf den Schnitten der Objektträger sichtbar. Bei niedriger Vergrößerung (6x) konnte zwischen Neuronen-spezifischer und unspezifischer Färbung (z.B. in Randbereichen oder an Umschlagfalten) differenziert werden. Die Hintergrundfärbung (bedingt durch endogene Peroxidaseaktivität) konnte soweit supprimiert werden, dass die dopaminergen Neurone klar abgrenzbar waren.

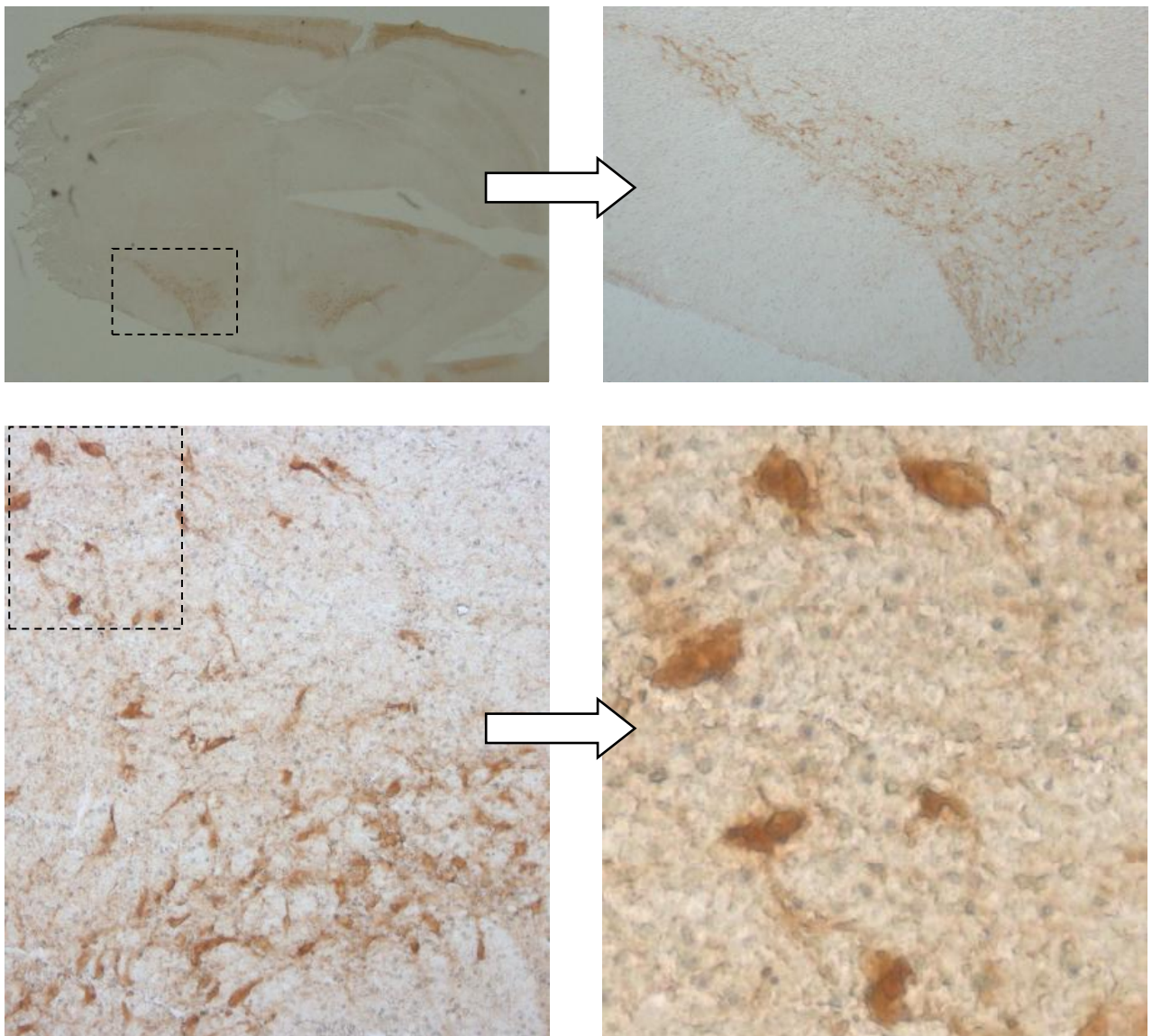


Abbildung 8: Übersicht bzw. Ausschnitte eines gefärbten Maushirn-Koronarschnittes mit SN in unterschiedlichen Vergrößerungen (6x bis 40x) (*eigene Arbeiten*)

Tabelle 14: Protokoll der TH-Färbung

Sofern nicht anders angegeben wurden sämtliche Schritte bei Raumtemperatur ausgeführt.

1.	Auftauen	30min
2.	Fixierung in eiskaltem Aceton	5min
3.	Trocknen	10min
4.	3x Waschen in PBST	3x 1min
5.	Blocken mit PBST, 10% Goat Serum und 1% BSA	30min
6.	Primär-Antikörper (Anti-TH) 1:100 verdünnt in PBST mit 1% Goat Serum & 1% BSA bei 37°C	1h
7.	3x Waschen in PBST	3x 1min
8.	Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit Poly HRP	30min
9.	3x Waschen in PBST	3x 1min
10.	Färbung mittels DAB-Chromogen/DAB-Puffer-Gemisch im Verhältnis 1:40	
11.	3x Waschen in PBST	3x 1min
12.	Dehydrierung durch 10x Tauchen der Schnitte in 100% Ethanol	1min
13.	Trocknen der Schnitte	20min
14.	Kryokonservierung bei -80°C bis zur weiteren Verwendung	

Tabelle 15: Reagenzien für TH-Färbung

Reagenzien	Produktbezeichnung/Katalognummer	Hersteller
Aceton	822251	Merck
Peroxidase-Blocking-Solution Anti-Mouse Poly-HRP DAB-Puffer DAB-Chromogen	Gebrauchsfertige Bestandteile des “Anti-Mouse Poly HRP IHC Detection Kit”, Ca. No. 2762	Chemicon/Millipore, U.S.
Goat-Serum	Ca. No. S26-Liter	Chemicon/Millipore, U.S.
Ultra PureBSA	B9001S	Biolabs
100% Ethanol	1.009.832.511	Merck
Rabbit Anti-TH-Antikörper	Rabbit Anti-TH-Antikörper, AB152	Chemicon/Milipore, U.S.

3.3.3.2. Selektion Tyrosinhydroxylase-positiver Neurone mittels Lasermikrodissektion

3.3.3.2.1. Grundlagen der Lasermikrodissektion

Mit Hilfe der LMD können einzelne Zellen aus Gewebeschnitten ausgeschnitten werden. Hierfür wird ein kohärenter gepulster Laserstrahl über ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Durch die hohe Energie des Lichts wird das Gewebe im Fokus zerstört. Werden viele Pulse aneinandergereiht, entsteht die gewünschte Schnittlinie. Der ausgeschnittene Bereich fällt gemeinsam mit der Trägermembran in ein Röhrchen für die anschließende DNA-Extraktion des Dissekats. Die Methode erfordert ein sogenanntes Lasermikrodissektionsmikroskop. Wie der Name bereits sagt, enthält das Gerät neben einem Diodenlaser mit 355nm Wellenlänge auch ein Mikroskop, so dass eine mikroskopisch kontrollierte Navigation der Dissektion mög-

lich ist. Hierfür wird zunächst der gewünschte Bereich fokussiert und die genauen Strukturen (Zellen etc.) markiert. Schließlich führt der Laser die Dissektion aus (Bohm C, 2005).



Abbildung 9: LMD-System: Leica LMD 7000 (Leica Microsystems)

3.3.3.2.2. Praktisches Vorgehen

Es erfolgte eine Vorauswahl an Objektträgern und Schnitten, bei denen makroskopisch die (gefärbte) SN sichtbar war.

Zunächst wurde die SN in der Übersicht des Maushirnschnittes bei niedriger Vergrößerung geortet. Schließlich wurde dieser Bereich schrittweise vergrößert, um erst geeignete Areale aufzufinden und anschließend einzelne Neurone mit hoher Auflösung darstellen zu können. Geeignete Neurone wurden bei 40facher Vergrößerung markiert und ausgelasert. Der Vorgang wurde mittels der integrierten Fotofunktion des LMD-Mikroskops dokumentiert. Pro Auffangbehälter wurden 10 Zellen gepoolt.

Die dopaminergen Neurone konnten erfolgreich ausgelasert und in entsprechenden Behältnissen aufgefangen werden.



Abbildung 10a,b,c: (a) angefärbte SN-Neurone (40x Vergrößerung), (b) mit Markierung für LMD (c) nach LMD (eigene Arbeiten)

Tabelle 16: LMD-System

Gerätschaft	Produktbezeichnung	Hersteller
LMD Mikroskop-System	Leica LMD 7000	Leica (Wetzlar)

3.3.3.3. Isolierung der DNA mittels Microextraktionskit

Die Isolierung der DNA aus den Einzelzellen erfolgte mittels eines gebrauchsfertigen Kits (QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen Germany) nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers („Isolation of Genomic DNA from Laser-Microdissected Tissues“).

Der erste Schritt der Extraktion, die Zugabe von 15µl ATL-Puffer, wurde bereits unmittelbar nach dem Auslasern der Zellen durchgeführt. In diesem Zustand wurden die Auffangbehälter mit den Zellen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Tabelle 17: Reagenzien und Gerätschaften für DNA-Extraktion aus Einzelzellen

Reagenzien/Gerätschaften	Produktbezeichnung/Katalognummer	Hersteller
QIAamp DNA Micro Kit	56304	Qiagen, Germany
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG

3.4. Untersuchung des Probenmaterials

3.4.1. Quantitative Darstellung von Deletionen und Bestimmung der Kopienanzahl mittels realtime PCR

Die Untersuchungen des Probenmaterials auf Deletionen und zur Kopienanzahlsbestimmung erfolgte mittels realtime PCR. Die Grundprinzipien der realtime PCR wurden bereits unter 3.2.1. dargelegt.

3.4.1.1. Grundlagen der Deletionsberechnung und der Bestimmung der relativen Kopienanzahl mittels realtime PCR

In Anlehnung an die bereits gut etablierte relative ND1/ND4-Methode für die Quantifizierung von Deletionen in humaner mtDNA (*He L, 2002; Krishnan KJ, 2007a*) wurde zunächst ein entsprechender Assay für murine mtDNA entwickelt.

Die ND1/ND4-Methode beruht auf der Beobachtung, dass bei Deletionen des ringförmigen mtDNA-Moleküls vorwiegend Teile des so genannten „major arcs“ (in diesem Bereich liegt das ND4-Gen) betroffen sind, wo hingegen im so genannten „minor arc“ (in diesem Bereich liegt das ND1-Gen) kaum Deletionen auftreten. Es werden also zwei mitochondriale Gene eines Moleküls quantitativ erfasst. Im Normalfall kommt auf eine ND1-Genkopie eine ND4-Genkopie, d.h. sämtliche mtDNA-Kopien weisen keine Deletionen auf. Eine Verminderung an ND4-Kopien in Relation zu zahlenmäßig unveränderten ND1-Kopien spricht für

Deletionen. Je stärker die ND4-Genmenge vermindert ist, desto höher ist der Deletionsgrad. Die relative Quantifizierung der Δ mtDNA erfolgt über folgende Formel:

$$\Delta\text{mtDNA}(\%) = (1 - 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}) * 100$$

Formel 5: Berechnung der mtDNA-Deletionen in Prozent (ND1/ND4-Methode)

Die Formel drückt das Verhältnis von deletierter mtDNA zu nicht deletierter mtDNA normalisiert mittels einer Standard-DNA aus Blut mit 0% Deletionen.

Inwieweit die Beobachtung, dass Deletionen überwiegend im „major arc“ auftreten, auch auf murine mtDNA zutrifft, ist bisher nicht bekannt. Nachdem in eigenen Untersuchungen innerhalb von Proben z.T. sowohl eine Verminderung der ND4-Genmengen als auch z.T. der ND1-Genmengen gemessen werden konnte, wurde die Methode weiterentwickelt.

Es wurden drei mitochondriale Gene ausgewählt, die einerseits (in etwa) im gleichen Abstand zueinander stehen und damit andererseits gleichmäßig über das ringförmige Mitom verteilt liegen. Bei den Genen handelt es sich um ND1 (Beginn ab Position mt2752), COX3 (Beginn ab Position mt8609) und CytB (Beginn ab Position mt14148).

Mittels realtime PCR wurden diese drei Gene quantitativ erfasst. Die Entwicklung der Methode beruht ebenso auf der Überlegung, dass im „Normalfall“, also bei mtDNA ohne Deletionen, die Menge der drei Gene zueinander im Verhältnis 1:1:1 stehen müsste. Eine Differenz dagegen spricht für Deletionen. Sämtliche Deletionslevels wurden mit einer Standard-DNA aus Mausblut normalisiert, welche keine Δ mtDNA enthält. Grundlage für die Berechnung des Deletionsgrades war das Verhältnis zweier Gene zueinander, wobei sämtliche möglichen Kombinationen (ND1/COX3; ND1/CytB; COX3/ND1; COX3/CytB; CytB/ND1; CytB/COX3) berücksichtigt wurden und jeweils der maximale Deletionsgrad gewertet wurde.

Zur **Normalisierung mittels Standard** wurden sämtliche Kombinationen in folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta\Delta\text{Ct}_{(\text{Gen1-Gen2})} = \text{Template-DNA}[Ct(\text{Gen1}) - Ct(\text{Gen2})] - \text{Standard}[Ct(\text{Gen1}) - Ct(\text{Gen2})]$$

Formel 6: Normalisierung der Ct-Werte mittels Standard für Deletionsberechnung (ND1/COX3/CytB-Methode)

Für die **Berechnung der maximalen Deletionen** wurde der **maximale $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert** in die folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta\text{mtDNA}(\%) = 1 - 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}(\text{max})} * 100$$

Formel 7: Berechnung des maximalen Deletionsgrades in Prozent (ND1/COX3/CytB-Methode)

Zur Bestimmung der Kopienanzahl innerhalb einer Probe wurde gleichzeitig das nukleäre codierte „Housekeepinggen“ β -Aktin (ACTB) quantitativ bestimmt. Während jede Zelle stets über einen diploiden Satz des ACTB-Gens verfügt, ist die Anzahl der mtDNA (und damit der drei mitochondrialen Gene) multipel und variabel innerhalb einer Zelle. D.h. über das Verhältnis der ACTB-Genmenge zu der mt-Genmenge kann auf die relative Kopienanzahl der mtDNA geschlossen werden. Für die Berechnung wurden zum einen die Werte auf die Standard-DNA normalisiert, zum anderen wurde (für jede Probe individuell) das quantitativ dominierende mitochondriale Gen ausgewählt, um das Risiko einer falsch niedrigen Kopienanzahl bedingt durch Deletionen zu vermindern.

Zur **Normalisierung mittels Standard** wurden die drei mitochondrialen Gene jeweils in folgende Formel eingesetzt:

$$\Delta\Delta Ct_{(mtGen-ACTB)} = \text{Template-DNA}[Ct(mtGen)-Ct(ACTB)] - \text{Standard}[Ct(mtGen)-Ct(ACTB)]$$

Formel 8: Normalisierung der Ct-Werte mittels Standard für Kopienanzahlberechnung

Für die **Berechnung der relativen Kopienanzahl** wurde der **minimale $\Delta\Delta Ct$ -Wert** (vgl. niedrige Ct-Werte entsprechen höherer Quantität) in die folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Relative Kopienanzahl}(mtDNA) = 2^{-\Delta\Delta Ct(\min)}$$

Formel 9: Berechnung der relativen mtDNA-Kopienanzahl

3.4.1.2. Praktisches Vorgehen

Das prinzipielle Vorgehen für die realtime PCR zur Deletions- bzw. Kopienanzahlbestimmung ist identisch mit dem der realtime PCR zur Genotypisierung. Allerdings müssen vier Mastermixe für drei mitochondriale Gene (ND1, COX3 und CytB) und einer für das nukleäre Referenzgen ACTB angesetzt werden. Dementsprechend wurden auch die Template-DNAs (hier: DNA aus Gewebekomogenaten bzw. Einzelzell-DNA) sowie die Blut-DNA und die Wasserprobe vierfach pipettiert. Siehe hierzu Abb. 11. Sämtliche Proben wurden in getrennten Läufen mindestens als Duplikate, viele auch als Triplikate durchgeführt. Der ACTB-Primer/Probe-Assay ist kommerziell erhältlich. Die drei Primer/Probe-Assays wurden individuell unter Angabe der gewünschten Primer-Probesequenzen hergestellt.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ND1 Standard	ND1 Standard	ND1 Standard	Le 20	Le 21	Le 27	Le 40	Le 41	Mu 20	Mu21	Mu27	Mu 40
COX3 Standard	COX3 Standard	COX3 Standard	Le 20	Le 21	Le 27	Le 40	Le 41	Mu 20	Mu21	Mu27	Mu 40
CytB Standard	CytB Standard	CytB Standard	Le 20	Le 21	Le 27	Le 40	Le 41	Mu 20	Mu21	Mu27	Mu 40
ACTB Standard	ACTB Standard	ACTB Standard	Le 20	Le 21	Le 27	Le 40	Le 41	Mu 20	Mu21	Mu27	Mu 40
Mu41	Ge 20	Ge21	Ge 27	Ge 40	Ge 41	He20	He21	He27	He40	He41	NTC
Mu41	Ge 20	Ge21	Ge 27	Ge 40	Ge 41	He20	He21	He27	He40	He41	NTC
Mu41	Ge 20	Ge21	Ge 27	Ge 40	Ge 41	He20	He21	He27	He40	He41	NTC
Mu41	Ge 20	Ge21	Ge 27	Ge 40	Ge 41	He20	He21	He27	He40	He41	NTC

Abbildung 11: Plattenbelegung für Deletionsuntersuchung und Kopienanzahlsbestimmung mittels realtime PCR

Grundvoraussetzung für die Quantifizierung ist Etablierung einer Standardkurve mit Parallelität der verschiedenen Gene. Siehe hierzu Abb.12.

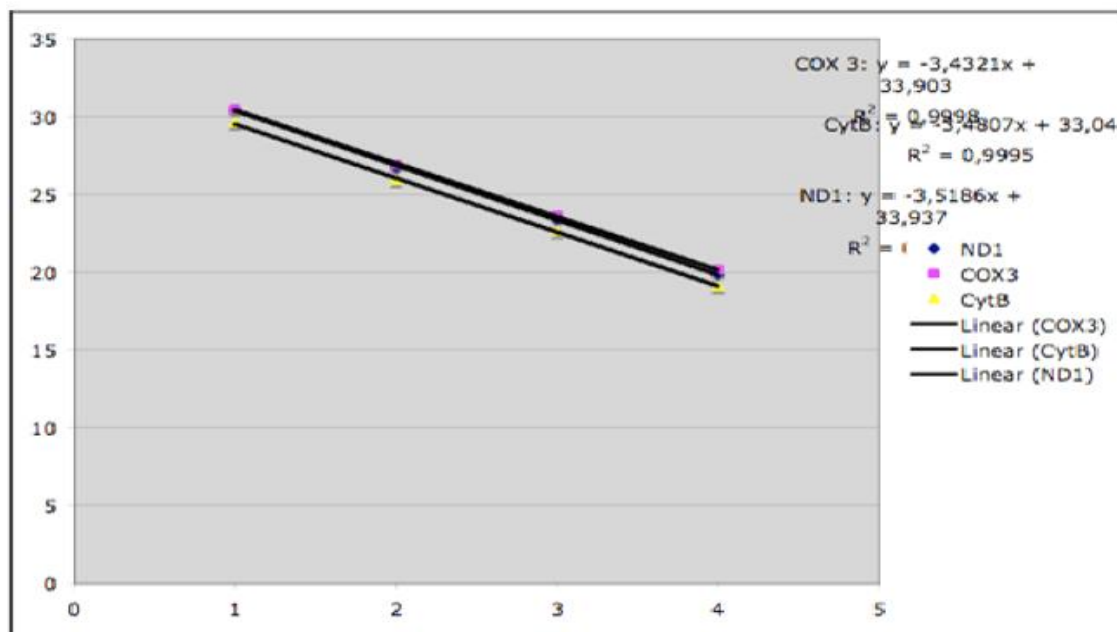


Abbildung 12: Etablierte Standardkurve für real-time PCR zur Deletionsberechnungen (ND1/COX3/CytB-Methode) (eigene Arbeiten)

Die Protokolle, Materialien, Geräte, Geräteeinstellungen und Primer wurden bereits unter 3.2.3. aufgeführt.

Tabelle 18: Protokoll der real-time PCR zur Deletionsbestimmung (ND1-Assay)

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Reaktion (µl)
Gene Expression Assay	2x	10
ND1-Primer/Probe-Assay	20x	1
ddH ₂ O		7
Template (DNA)		2
<i>Totales Volumen je Reaktion</i>		20

Tabelle 19: Protokoll der realtime PCR zur Deletionsbestimmung (COX3-Assay)

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Reaktion (µl)
Gene Expression Assay	2x	10
COX3-Primer/Probe-Assay	20x	1
ddH ₂ O		7
Template (DNA)		2
<i>Totales Volumen je Reaktion</i>		20

Tabelle 20: Protokoll der realtime PCR zur Deletionsbestimmung (CytB-Assay)

Reagenz	Konzentration	Volumen pro Reaktion (µl)
Gene Expression Assay	2x	10
CytB-Primer/Probe-Assay	20x	1
ddH ₂ O		7
Template (DNA)		2
<i>Totales Volumen je Reaktion</i>		20

Tabelle 21: Primer und Probes für realtime PCR zur Deletionsbestimmung (ND1/COX3/CytB)

Primer und Probes
ND1 forward Primer mt3112-3136
ND1 Probe mt3154-3169
ND1 reverse Primer mt3210-3169
COX3 forward Primer mt8921-8945
COX3 Probe mt8957-8972
COX3 reverse Primer mt8998-8974
CytB forward Primer mt14614-14639
CytB Probe mt14668-14685
CytB reverse Primer mt14718-14694

Tabelle 22: Reagenzien für realtime PCR zur Deletionsbestimmung

Reagenzien	Produktbezeichnung/Katalognummer	Hersteller
TaqMan® Gene Expression Assay	4331182	Applied Biosystems, Germany
ACTB Primer-Probe-Assay	Mouse ACTB Endogenous Control, 4352933E	Applied Biosystems, Germany
Micro Amp Fast optical 96-Well	4346906	Applied Biosystems, Germany
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG
Step One™ Real-Time-PCR Systems	4376374	Applied Biosystems, Germany
ND1 Primer-Probe-Assay	Primer-Probe-Assay:Custom design	Applied Biosystems, Germany
COX3 Primer-Probe-Assay	Primer-Probe-Assay:Custom design	Applied Biosystems, Germany
CytB Primer-Probe-Assay	Primer-Probe-Assay:Custom design	Applied Biosystems, Germany

3.4.1.3. Statistische Auswertung der Rohdaten

Die Rohdaten wurden in das Programm „Microsoft Excel“ zur Berechnung exportiert und anschließend wurden die berechneten Werte mittels „SPSS“ statistisch ausgewertet. Die grafische Darstellung erfolgte mittels des Programms „R“. Die verwendete Hard- und Software wurde bereits unter 3.2.3. aufgeführt.

Nach der Berechnung der einzelnen Deletions- bzw. Kopienanzahlswerte erfolgte die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung gruppenspezifisch sortiert nach Genotyp bzw. Organ. Wurden zwei unterschiedliche Gruppen miteinander verglichen (z.B. Wildtypen vs. Heterozygote bei den einjährigen Tieren), wurde jeweils ein zweiseitiger T-Test angewendet. Der Vergleich von drei unterschiedlichen Gruppen (z.B. Wildtypen, Heterozygote und Knock-Outs bei den einjährigen Tieren) wurde mittels zweiseitiger ANOVA durchgeführt.

Anschließend erfolgte eine Korrelation von Deletionen vs. Kopienanzahl innerhalb gleicher Alters- und Organgruppen mittels Pearsons-Korrelationskoeffizienten. Zur Beurteilung der zeitlichen Dynamik der Deletionsbelastung bzw. der relativen Kopienanzahl wurden neugeborene vs. einjährige Tiere innerhalb gleicher Organgruppen und Genotypen miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die relative Häufigkeit von Deletionen im „minor bzw. major arc“ der mtDNA untersucht.

Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $p < 0.05$ akzeptiert.

3.4.3. Qualitative Darstellung von Deletionen mittel nested long PCR

3.4.3.1. Grundlagen der nested long PCR

Während mit einer Standard-PCR lediglich DNA-Fragmente bis zu einer Größe von ca. 5kBp amplifiziert werden können, bietet die long PCR die Möglichkeit, DNA-Fragmente von bis zu einer Länge von 40kBp zu amplifizieren. Dies ist dadurch möglich, dass besonders stabile DNA-Polymerasen zum Einsatz kommen.

Der Zusatz „nested“ bedeutet „verschachtelt“, d.h. die PCR-Reaktion erfolgt in zwei Runden mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren, wobei das Produkt der ersten Runde als Template für die zweite Runde dient. Die Primer der zweiten Runde binden an die Sequenz des Produkts der ersten Runde, so dass die Ausbeute gesteigert werden kann. Die Methode eignet sich damit zum Nachweis geringster DNA-Mengen.

Die auf diese Weise vervielfältigten DNA-Fragmente können nun auf ein Ethidiumbromidhaltiges Gel aufgetragen werden und mittels Elektrophorese aufgetrennt werden, so dass durch die Interkalation von Ethidiumbromid mit der DNA unter UV-Licht Banden sichtbar werden. Je nach Größe und Ladung der Teilchen differiert die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Mit Hilfe einer gleichzeitig aufgetragenen Referenz („Ladder“) kann die Größe der Fragmente abgeschätzt werden.

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften eignet sich die long PCR damit zur Amplifikation des 16kBp großen mitochondrialen Genoms. Aus technischen Gründen können allerdings nur 14kBp amplifiziert werden. Bei voller Integrität des Mitoms wären die einzigen Produkte der Reaktion 14kBp lange DNA-Fragmente, die als so genannte Wildtyp-Bande zur Darstellung kommen. Weitere, kürzere Bande stellen Fragmente der mtDNA dar und können als Hinweis auf Deletionen gewertet werden.

3.4.3.2. Praktisches Vorgehen

Die Reagenzien für die erste Runde wurden gemäß den Herstellerangaben des „Expand Long Range Kits“ und nach dem untenstehenden Protokoll zusammenpipettiert. Die Template-DNA wurde zuvor auf 5ng/µl äquilibriert, so dass bei 2µl Template-DNA pro Reaktion jeweils 10ng Template-DNA eingesetzt wurden. Zusätzlich zu den Template-DNAs wurde pro Lauf auch eine Wasserprobe als Negativkontrolle und eine Blut-DNA-Probe als Referenz mit angesetzt.

Für die zweite Runde wurden die Produkte der ersten Runde mit ddH₂O verdünnt als Template-DNA eingesetzt. Der Grad der Verdünnung wurde variiert und bewegte sich zwischen 1:10 und 1:160.

Die Reaktionen selbst wurden entsprechend der untenstehenden Geräteeinstellung in einem „Thermalcycler“ durchgeführt.

Nach Beendigung der zweiten Runde wurden 12µl der amplifizierten Produkte mit 2µl Lade-puffer gemischt und auf ein 1% Agarosegel mit entsprechenden Taschen aufgetragen. Die Herstellung des Agarosegels erfolgte nach dem untenstehenden Protokoll. Zusätzlich zu den PCR-Produkten wurde rechts bzw. links außen 6µl einer sogenannten „Ladder“ aufgetragen. Diese dient als Referenz zur Bestimmung der Produktlänge. Nach der Beladung des Gels wurde dieses in eine TBE-haltige Elektrophoresekammer eingelegt und die Elektroden so angeschlossen, dass sich die Negativelektrode bei den Taschen befand (vgl. DNA ist negativ geladen, d.h. sie wandert vom Minus- zum Pluspol). Das Gerät wurde entsprechend der relativ niedrigen Dichte des Gels auf 0,4V eingestellt.

Nach ca. einer Stunde wurde das Gel erstmalig unter UV-Licht gelegt und fotografiert. Ggf. wurde das Gel erneut eingelegt und zu einem späteren Zeitpunkt nochmals fotografiert, da die Wanderungsgeschwindigkeit u.a. eine Variable der Zeit ist. Die durchschnittliche Laufdauer betrug ca. zwei Stunden: Nach dieser Zeit waren (sofern vorhanden) verschiedene Banden sichtbar und gut gegeneinander abgrenzbar.

Tabelle 23: Protokoll für die erste Runde der long PCR

Reagenzien	Menge in µl
Magnesiumhaltiger Puffer (5x konz.)	10
10nM dNTP-Mix	2,5
Primer Forward 3F	1,5
Primer Reverse 0R	1,5
Enzymmix mit Taq-Polymerase (700U)	0,75
BSA (in ddH ₂ O auf 1:100 verdünnt)	10
100% DMSO	3
Template DNA (10ng)	2
ddH ₂ O	21,75
Summe	50

Tabelle 24: Protokoll für die zweite Runde der long PCR

Reagenzien	Menge in µl
Magnesiumhaltiger Puffer (5x konz.)	10
10nM dNTP-Mix	2,5
Primer Forward 20F	1,5
Primer Reverse 4R	1,5
Enzymmix mit Taq-Polymerase (700U)	0,75
BSA (in ddH ₂ O auf 1:100 verdünnt)	10
100% DMSO	3
Template DNA (Produkt der 1. Runde, z.T. verdünnt)	2
ddH ₂ O	21,75
Summe	50

Tabelle 25: Primer für long PCR

Primer	Primersequenz
<i>Primer der ersten Runde</i>	
Forward Primer 3F mt2407	TCGACAATTAGGGTTTACGA
Reverse Primer 0R mt42	AAGCATTTTCAGTGCTTTGC
<i>Primer der zweiten Runde</i>	
Forward Primer 20F mt16005	GGGTTTTGCGGACTAATGAT
Reverse Primer 4R mt3269	TCATATGTGTTCTTGGGTTG

Tabelle 26: Geräteeinstellung für long PCR (erste und zweite Runde)

Schritt	Temperatur	Zeit	Besonderheiten
1	93°C	2min	
2	93°C	30s	d.h. Schritt 2-4 insgesamt 10mal
3	58°C	30s	
4	68°C	15min	
5	<i>Gehe zu 2, 9mal</i>		
6	93°C	30s	d.h. Schritt 6-8 insgesamt 20mal
7	58°C	30s	
8	68°C	15min	pro Zyklus 20s länger
9	<i>Gehe zu 6, 19mal</i>		
10	68°C	10min	
11	4°C	unbegrenzt	

Tabelle 27: Protokoll zur Herstellung eines 1% Agarosegels mit kleinen Taschen für große KammerHerstellung eines 1% Agarosegels mit kleinen Taschen für große Kammer

Schritt	Vorgehen
1.	2g Agarose abwiegen, in 200ml TBE auflösen
2.	Gemisch in der Mikrowelle für 3-4min erhitzen, bis klare Flüssigkeit sichtbar ist; diese muss nun 1min richtig kochen
3.	Gemisch (evtl. unter kaltem H ₂ O) etwas abkühlen lassen
4.	Herrichten der Kammer: Kamm mit kleinen Taschen so einstellen, dass dieser den Boden knapp nicht berührt
5.	9µl Ethidium-Bromid zu dem Gemisch pipettieren, unter Schwenken lösen, so dass homogene Lösung entsteht
6.	So viel Gel in die Kammer gießen, dass kleiner Rest der Hälse frei bleibt
7.	Gel für ca. 1h abkühlen und fest werden lassen
8.	Nach dem Entfernen des Kamms ist das Gel gebrauchsfertig

Tabelle 28: Reagenzien und Verbrauchsmaterial für die long PCR

Reagenzien/Verbrauchsmaterial	Produktnummer/Bezeichnung	Hersteller
Magnesiumhaltiger Puffer 10nM dNTP-Mix Enzymmix mit Taq-Polymerase (700U) 100% DMSO	Gebrauchsfertige Bestandteile des „Expand Long Range, dNTP Pack“- Sets, Cat. No 04829042001	Roche Diagnostics GmbH Penzberg, Deutschland
Primer		MGB
Ultra Pure BSA	B9001S	BioLabs
Agarose	840004	Biozym Scientific GmbH
Ethidiumbromid	E1510-10ml	Sigma Aldrich
Gel Pilot 1kb Ladder	239085	Qiagen
Tube Strips 0,2µl	82-0266-A	Peqlab Biotechnologie GmbH

Tabelle 29: Geräte für long die PCR

Geräte	Produktbezeichnung	Hersteller
Thermal Cycler	PTC-200 Pettier Thermal Cycler	MJ Research
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Gelanalyse-Gerät	Apagel Midi-Wide Biometra	Biomed Analytik GmbH
Ultraviolett Transluminator	46514	Peqlab Biotechnologie GmbH
Thermomixer compact	5350 2274	Eppendorf AG
Digitalkamera	E990	Nikon

4. Ergebnisse

4.1. Genotypisierung mittels realtime PCR

Die Genotypisierung erfolgte mittels realtime PCR. Diese ermöglichte die eindeutige Klassifikation in die drei Gruppe Wildtypen, Heterozygote und Knock-Outs. Die prozentuale Verteilung wich von der nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Verteilung ab. Während die Heterozygoten mit 70,77% überrepräsentiert waren, waren die Wildtypen mit 21,35 leicht und die Knock-Outs mit 7,85% deutlich unterrepräsentiert. Die Ergebnisse sind damit abweichend zu bisher publizierten Arbeiten (*Lebovitz RM, 1996*). Hier entsprach die Verteilung den Mendelschen Regeln.

Tabelle 30: Verteilung der Genotypen

Genotypen	Anzahl	Anteil (in %)	Erwartete Verteilung (nach Mendelschen Regeln)
Wildtypen	19	21,35	25
Heterozygote	63	70,77	50
Knock-Outs	7	7,87	25
Summe	89	100	100

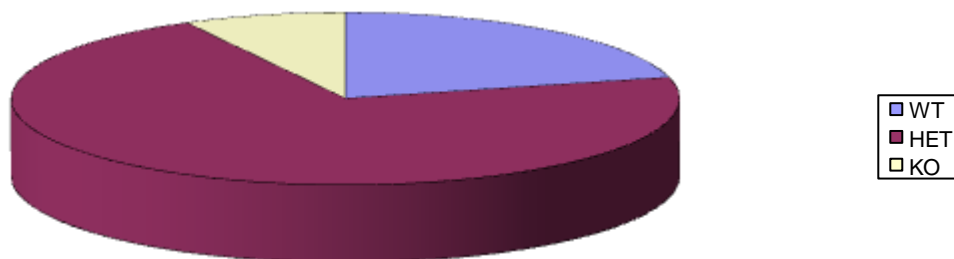


Abbildung 13: Verteilung der Genotypen

Die Plausibilität des SOD2-Modells konnte von einem anderen Mitglied der Arbeitsgruppe „Mitochondriale Neurogenetik“ mittels 8-OHdG ELISA bestimmt werden: Hier zeigte sich eine Korrelation zwischen SOD2-Defizienz und 8-OHdG, einem Marker für oxidativen Stress. Die detaillierte Vorgehensweise und die Ergebnisse werden im Rahmen dieser Arbeit nicht näher ausgeführt, da diese nicht von der Verfasserin selbst ausgeführt wurden.

4.2. Quantitative Darstellung von Deletionen und Bestimmung der Kopienanzahl mittels realtime PCR

Sowohl bei neugeborenen als auch bei einjährigen Tieren erfolgte eine quantitative Darstellung von Deletionen und eine Bestimmung der Kopienanzahl mittels realtime PCR. Bei den Neugeborenen wurde Herz- und Gehirnhomogenat untersucht, bei den einjährigen Tieren erfolgten zusätzliche Untersuchungen der mtDNA aus Muskel- bzw. Leberhomogenat.

Desweiteren wurde Alters- und Organgruppen spezifisch die relative Kopienanzahl vs. Deletionen korreliert. Außerdem wurde die relative Häufigkeit von Deletionen im „minor“ bzw. „major arc“ bestimmt.

4.2.1. Homogenatsuntersuchungen bei neugeborenen Tieren

Zunächst erfolgten Untersuchungen zu Δ mtDNA und Kopienanzahlsbestimmung aus Herz- bzw. Gehirnhomogenat der Neugeborenen.

Die Wildtypen wiesen sowohl für Herzhomogenat als auch für Gehirnhomogenat die niedrigsten Deletionswerte auf. Im Gehirn war die gemessene Deletionsbelastung höher als im Herz.

Die höchsten Deletionswerte zeigte für beide Organe die Gruppe der Heterozygoten, wobei hier das Herz etwas stärker von Δ mtDNA betroffen war.

Damit nahm die Gruppe der Knock-Outs hinsichtlich der Deletionsbelastung eine Mittelstellung ein. Hier war kein Unterschied zwischen den Organen nachweisbar.

In der zweiseitigen ANOVA zeigte sich im Herzhomogenat ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wobei die Heterozygoten im Vergleich zu den Knock-Outs etwas höhere Werte aufwiesen. D.h. ein dosisabhängiger Effektz der SOD2-Defizienz war nicht nachweisbar. Für das Gehirn war in der zweiseitigen ANOVA kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar.

Die genauen Werte sind den Tabelle 31 und 32. zu entnehmen.

Abbildung 15 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Ergänzend dazu in Abb. 14 die Legende für die verwendeten Boxplots.



Abbildung 14: Legende für verwendete Boxplots (Wikipedia)

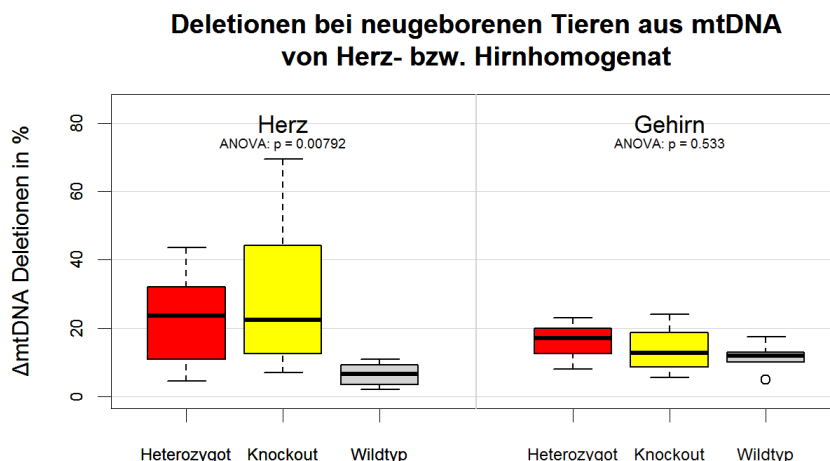


Abbildung 15: Deletionen bei neugeborenen Tieren aus mtDNA von Herz-bzw. Hirnhomogenat

Tabelle 31: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von Herzhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote	Knock-Outs
<i>Mittelwert</i>	6,2	29,7	30,4
<i>Standardabweichung</i>	3,0	21,9	25,9

Tabelle 32: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von Gehirnhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote	Knock-Outs
<i>Mittelwert</i>	11,5	15,8	13,8
<i>Standardabweichung</i>	4,6	5,4	7,7

Bei der relativen Kopienanzahlbestimmung nahm die Gruppe der Wildtypen in der jeweiligen Organgruppe eine Intermediärstellung ein, wobei die relative Kopienanzahl im Herz höher als im Gehirn war.

Die Gruppe der Heterozygoten wies in beiden Gruppen eine niedrigere relative Kopienanzahl auf, wobei auch hier die relative Kopienanzahl im Herz höher als im Gehirn lag.

In der Gruppe der Knock-Outs zeigten sich für beide Gruppen die höchsten Werte. Auch hier war die relative Kopienanzahl im Herz höher als im Gehirn.

Insgesamt ergab sich in der zweiseitigen ANOVA jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Abbildung 16 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die genauen Werte sind den Tabellen 33 und 34 zu entnehmen.

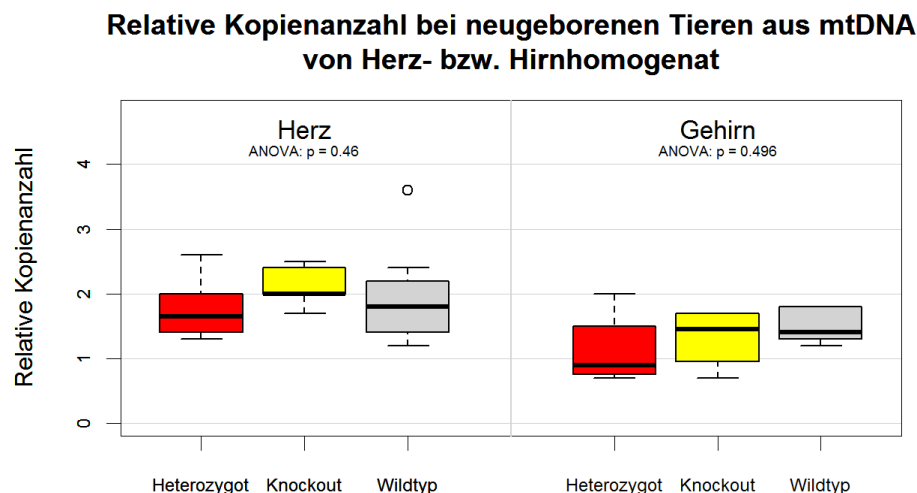


Abbildung 16: Relative Kopienanzahl bei neugeborenen Tieren aus mtDNA von Herz- bzw. Hirnhomogenat

Tabelle 33: Relative Kopienanzahl bei Neugeborenen aus mtDNA von Herzhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote	Knock-Outs
<i>Mittelwert</i>	1,9	1,8	2,1
<i>Standardabweichung</i>	0,7	0,5	0,3

Tabelle 34: Relative Kopienanzahl bei Neugeborenen aus mtDNA von Gehirnhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote	Knock-Outs
<i>Mittelwert</i>	1,5	1,1	2,0
<i>Standardabweichung</i>	0,3	0,5	1,6

Bei der Korrelation der relativen Kopienanzahl vs. Deletionen zeigt sich sowohl für Herz- als auch für Hirnhomogenat nur eine schwach positive Korrelation. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 und 18 grafisch dargestellt.

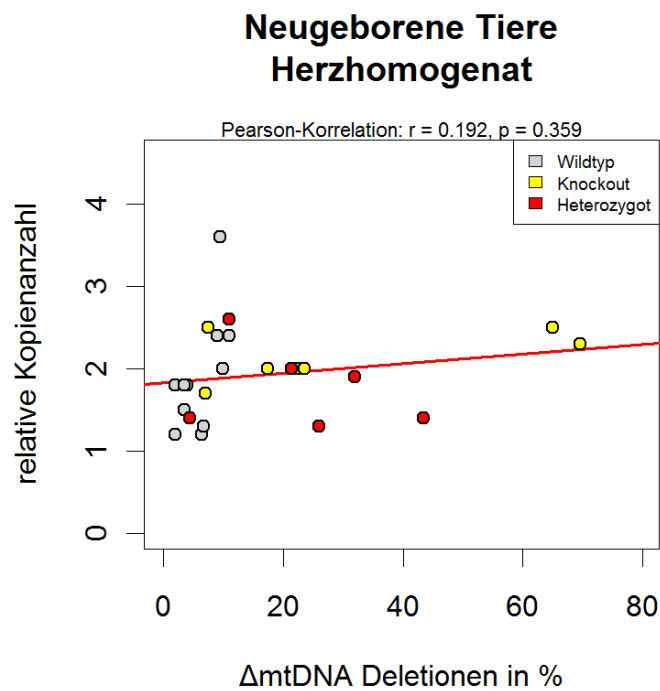


Abbildung 17: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Herzhomogenat von neugeborenen Tieren

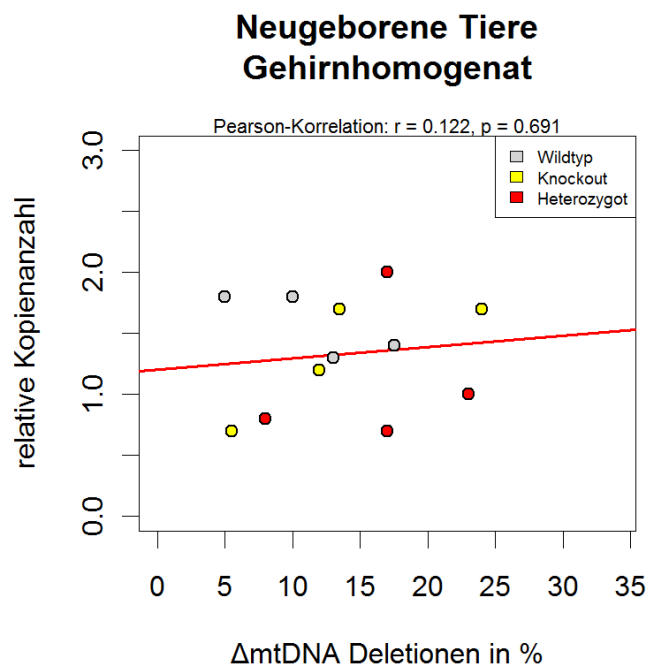


Abbildung 18: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Hirnhomogenat von neugeborenen Tieren

4.2.2. Homogenatsuntersuchungen bei einjährigen Tieren

In der Gruppe der einjährigen Tiere erfolgten Untersuchungen zu Δ mtDNA und relativer Kopienanzahlbestimmung aus Homogenaten von Herz, Muskel, Gehirn und Leber.

Bei den einjährigen Tieren wies die Gruppe der Wildtypen in allen vier Organgruppen jeweils höhere Deletionswerte auf als die Gruppe der Heterozygoten. Während in den Gruppen für Herz, Muskel und Gehirn ähnliche Deletionswerte gemessen wurden, war die Deletionsbelastung in der Gruppe der Leber in Relation zu den anderen Organgruppen etwa doppelt so hoch. Die niedrigsten Werte zeigte sich im Muskel gefolgt von Herz und Gehirn. Auch in der Gruppe der Heterozygoten wies die Gruppe der Leber mit Abstand die höchsten Deletionswerte auf. Bei den anderen drei Organgruppen waren deutlichere Unterschiede in der Deletionsbelastung nachweisbar als bei der Gruppe der Wildtypen. Hier wies der Muskel die höchsten Deletionswerte auf. Herz und Gehirn zeigten in etwa gleiche, in Relation zum Muskel deutlich (ca. 50%) reduzierte, Werte.

Im zweiseitigen T-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Abbildung 19 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die genauen Werte sind den Tabellen 35 bis 39 zu entnehmen.

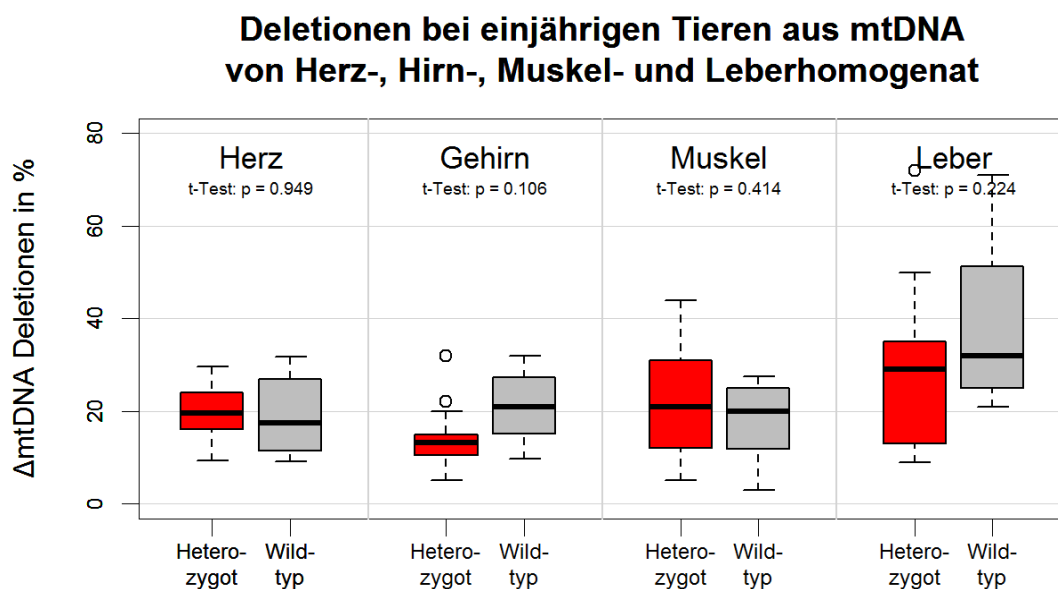


Abbildung 19: Deletionen bei einjährigen Tieren aus mtDNA von Herz-, Hirn-, Muskel- und Leberhomogenat

Tabelle 35: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Herzhomogenat

Genotypen	Wildtypen	Heterozygote
Mittelwert	19,3	19,6
Standardabweichung	10,5	5,9

Tabelle 36: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Muskelhomogenat

Genotypen	Wildtypen	Heterozygote
Mittelwert	17,7	21,9
Standardabweichung	8,8	12,4

Tabelle 37: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Gehirnhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	21,0	14,3
<i>Standardabweichung</i>	5,7	6,7

Tabelle 38: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von Leberhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	39,5	28,2
<i>Standardabweichung</i>	21,7	18,8

Die Gruppe der Wildtypen zeigte - mit Ausnahme der Leber - in den drei anderen Organgruppen niedrigere relative Kopienanzahlen als die Gruppe der Heterozygoten.

In der Gruppe der Wildtypen wurde für das Gehirn die niedrigste relative Kopienanzahl gemessen. Für Herz, Muskel und Leber ergaben sich ähnliche Mittelwerte, die deutlich (ca. 1,5 bis 2fach) über dem Mittelwert für das Gehirn lagen.

Bei der Gruppe der Heterozygoten ergaben sich - von der Leber abgesehen - höhere Mittelwerte. Die höchste relative Kopienanzahl wurde im Herz gemessen, mit deutlichem Abstand folgten Muskel, Leber und Gehirn.

Im zweizeitigen T-Test zeigte sich hinsichtlich relativer Kopienanzahl im Herz ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und Heterozygoten. Die relative Kopienanzahl war bei den Heterozygoten in Relation zu den Wildtypen signifikant erhöht.

Abbildung 20 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die genauen Werte sind den Tabellen 39 bis 42 zu entnehmen.

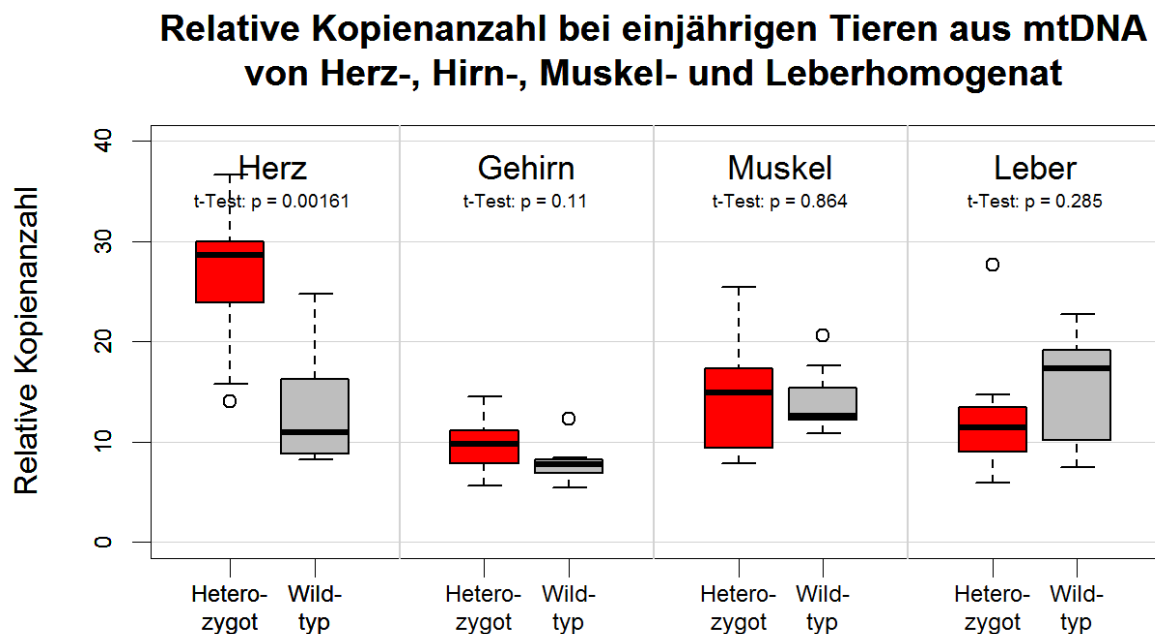


Abbildung 20: Relative Kopienanzahl bei einjährigen Tieren aus mtDNA von Herz-, Hirn-, Muskel- und Leberhomogenat

Tabelle 39: Relative Kopienanzahlbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Herzhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	13,3	26,9
<i>Standardabweichung</i>	7,1	6,8

Tabelle 40: Relative Kopienanzahlbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Muskelhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	14,1	14,5
<i>Standardabweichung</i>	4,1	5,6

Tabelle 41: Relative Kopienanzahlbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Gehirnhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	7,9	9,7
<i>Standardabweichung</i>	2,5	2,4

Tabelle 42: Relative Kopienanzahlbestimmung der einjährigen Tiere aus mtDNA von Leberhomogenat

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	15,2	12,1
<i>Standardabweichung</i>	6,3	5,7

Bei der Korrelation der relativen Kopienanzahl vs. Deletionen zeigten sich in Abhängigkeit des Organs unterschiedliche Ergebnisse: Für Muskel und Leber war eine schwach positive Korrelation nachweisbar, für das Gehirn ergab sich kein linearer Zusammenhang und das Herz zeigte eine negative Korrelation. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 21 bis 24 grafisch dargestellt.

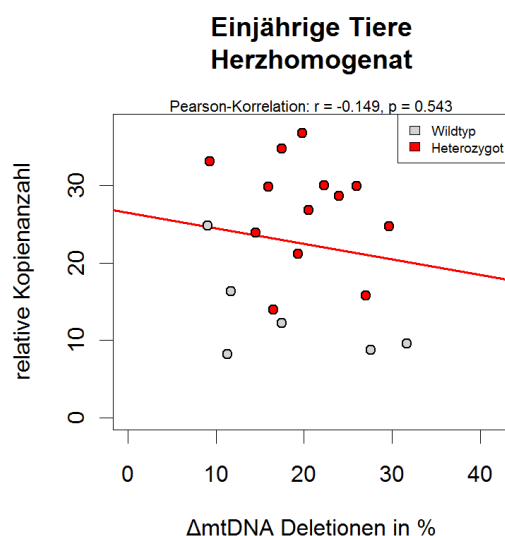


Abbildung 21: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Herzhomogenat von einjährigen Tieren

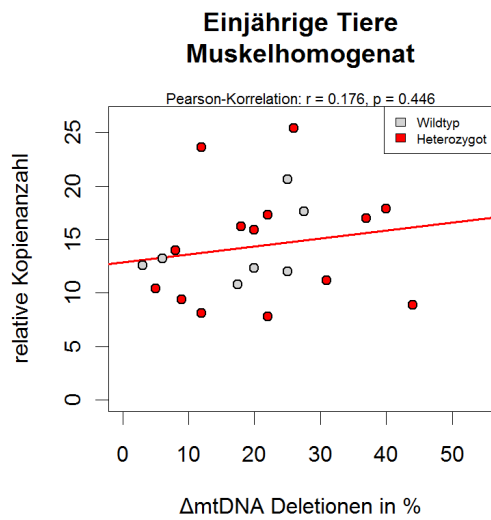


Abbildung 22: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Muskelhomogenat von einjährigen Tieren

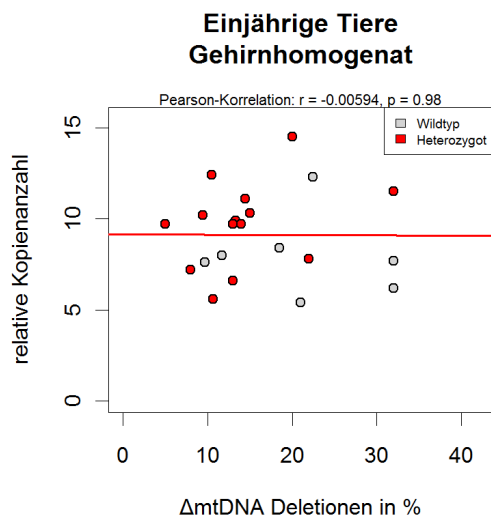


Abbildung 23: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Hirnhomogenat bei einjährigen Tieren

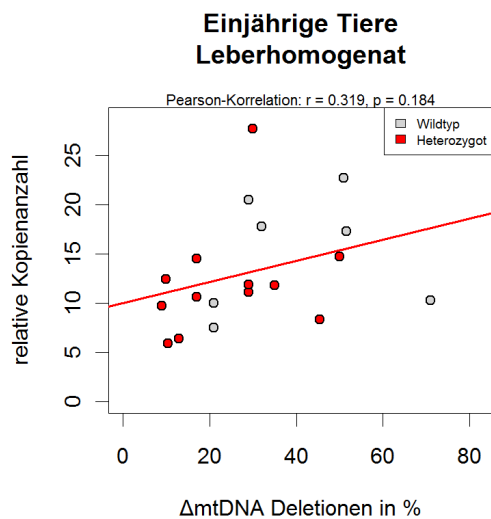


Abbildung 24: Korrelation relative Kopienanzahl vs. Deletionen für Leberhomogenat bei einjährigen Tieren

4.2.3. Zeitliche Dynamik der Deletionsbelastung

Zur Beurteilung der zeitlichen Dynamik der Deletionsbelastung erfolgte ein Vergleich neugeborener Tiere mit einjährigen Tieren bei gleichem Genotyp (Wildtyp bzw. Heterozygot) und Organ (Herz bzw. Gehirn).

Während junge Heterozygote a priori sowohl im Herz als auch im Gehirn ein höheres Deletionsniveau aufwiesen als alte, ohne dass der Unterschied signifikant wäre ($p > 0,05$), zeigte sich bei den Wildtypen eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der Deletionsbelastung bei älteren Tieren. Abbildung 25 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

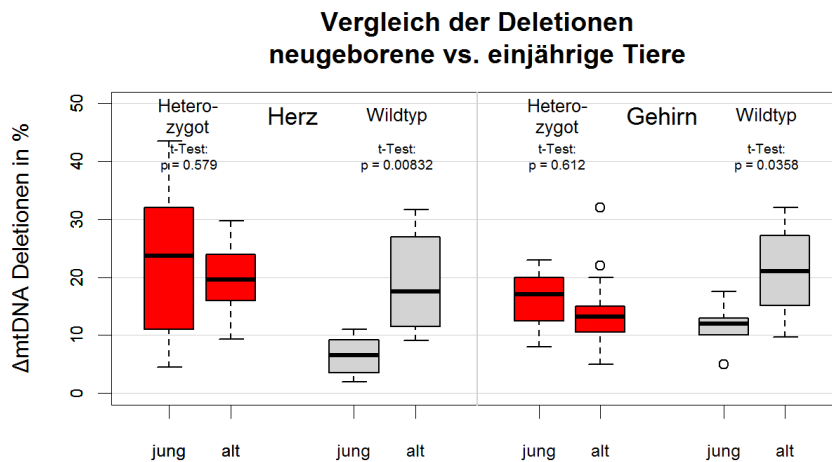


Abbildung 25: Vergleich der Deletionen neugeborene vs. einjährige Tiere

4.2.4. Zeitliche Dynamik der relativen Kopienanzahl

Zur Beurteilung der zeitlichen Dynamik der relativen Kopienanzahl erfolgte ein Vergleich neugeborener Tiere mit einjährigen Tieren bei gleichem Genotyp (Wildtyp bzw. Heterozygot) und Organ (Herz bzw. Gehirn). Bei beiden Genotypen und in beiden Organgruppen zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der relativen Kopienanzahl bei älteren Tieren. Abbildung 26 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

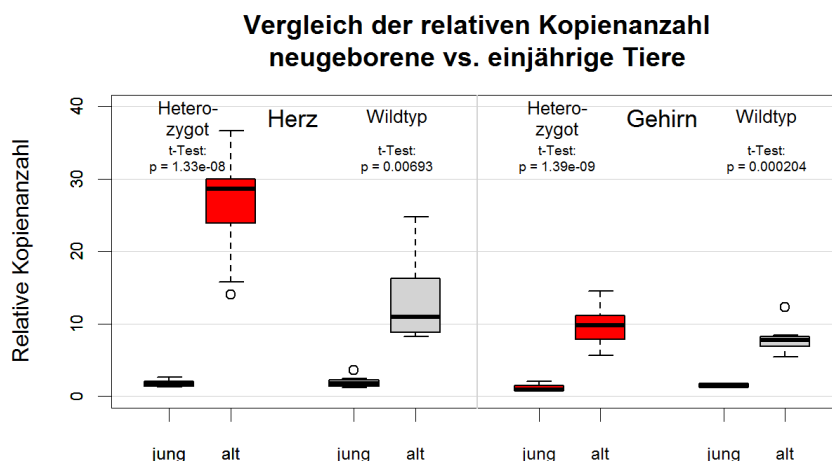


Abbildung 26: Vergleich der relativen Kopienanzahl neugeborene vs. einjährige Tiere

4.2.5. Relative Verteilung von Deletionen auf „minor“ bzw. „major arc“

Mittels realtime PCR wurden drei Gene (ND1, COX3, CytB) quantifiziert. Während COX3 und CytB im „major arc“ liegen, ist ND1 im „minor arc“ lokalisiert. Die niedrigste Menge wurde als Marker für die Position auf dem ringförmigen mtDNA-Molekül mit den meisten Deletionen gewertet.

Die Startposition des amplifizierten Gens ist unterhalb des Gennamens angegeben. Wie aus der Grafik ersichtlich wird, betreffen mehr als 85% den „major arc“. Abbildung 27 stellt die Ergebnisse grafisch dar.

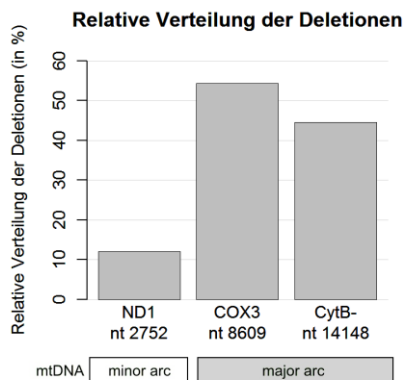


Abbildung 27: Relative Verteilung der Deletionen

4.3. Identifikation dopaminergener Neurone der Substantia Nigra

4.3.2. Ergebnisse Einzelzelluntersuchungen

Im Vergleich der zwei Altersgruppen, zeigten die Neugeborenen in beiden Gruppen eine höhere Deletionsbelastung als die älteren Tiere.

In den Einzelzelluntersuchungen zeigte sich mit 46,3% bei den Wildtypen und 52,3% bei den Knock-Outs eine hohe Deletionsbelastung in SN-Neuronen von Neugeborenen.

Damit waren die Knock-Outs stärker belastet. Allerdings war im zweiseitigen T-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen feststellbar. Abbildung 28 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die genauen Werte sind der Tabelle 43 zu entnehmen.

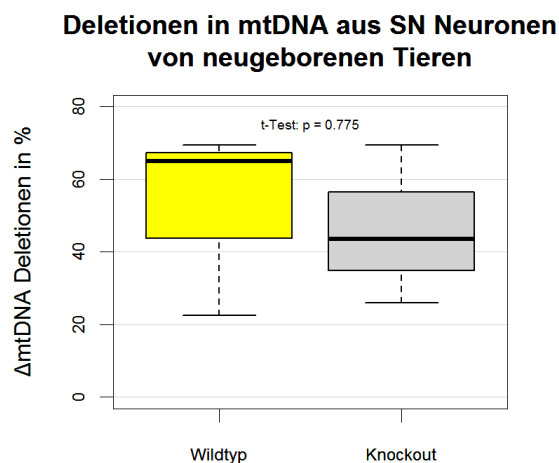


Abbildung 28: Deletionen in der mtDNA aus SN Neuronen von neugeborenen Tieren

Tabelle 43: Deletionen (in Prozent) der Neugeborenen aus mtDNA von SN Neuronen

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Knock-Outs
<i>Mittelwert</i>	46,3	52,3
<i>Standardabweichung</i>	21,9	25,9

In der Gruppe der einjährigen Tiere lag die Deletionsbelastung in SN-Neuronen für die Wildtypen bei 23%, für die Heterozygoten bei 27%. Auch hier wiesen die Wildtypen eine geringere Deletionsbelastung auf.

Im zweiseitigen T-Test zeigte sich auch bei den einjährigen Tieren kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen. Abbildung 29 stellt die Ergebnisse grafisch dar. Die genauen Werte sind der Tabelle 44 zu entnehmen.

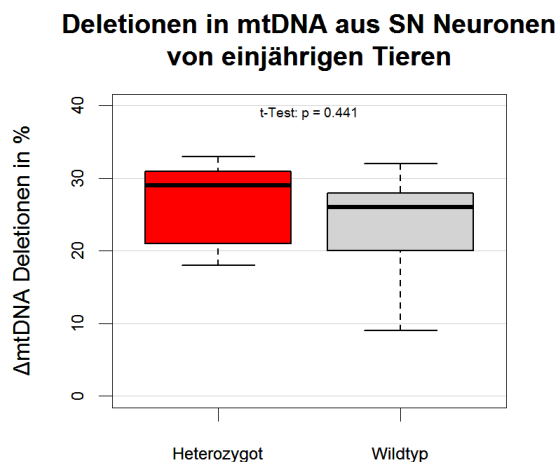


Abbildung 29: Deletionen in der mtDNA aus SN Neuronen von einjährigen Tieren

Tabelle 44: Deletionen (in Prozent) der einjährigen Tiere aus mtDNA von SN Neuronen

<i>Genotypen</i>	Wildtypen	Heterozygote
<i>Mittelwert</i>	23,0	27,0
<i>Standardabweichung</i>	9,0	6,1

4.4. Qualitative Darstellung von Deletionen mittels nested long PCR

Für das unten abgebildete Gel (Abbildungen 30, A1) wurden long-PCR-Produkte der zweiten Runde von DNA aus Herzhomogenat von ca. einjährigen Wildtyp- bzw. Heterozygoten-Mäusen verwendet. Sowohl bei Wildtypen als auch bei Heterozygoten wurden zusätzlich zur Wildtyp-Bande weitere Banden sichtbar, die Ausdruck von Δ mtDNA sind. Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges der ersten Runde wurden, bei den letzten fünf Spuren rechts außen, Produkte der ersten Runde aufgetragen (Abbildung 30, A2). Erwartungsgemäß stellte sich lediglich die Wildtyp-Bande dar. Die Ausbeute für Deletionen war offenbar noch zu gering. Mit der zweiten Runde konnte die Ausbeute soweit gesteigert werden, dass auch die Deletionen sichtbar gemacht werden konnten.

Die long PCR wurde auch für Gehirnhomogenat von Neugeborenen Mäusen der SOD2-Reihe durchgeführt. Nachdem aber mitunter gleichermaßen Deletionen bei Wildtypen, Heterozygoten und Mutanten sichtbar waren, wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt.

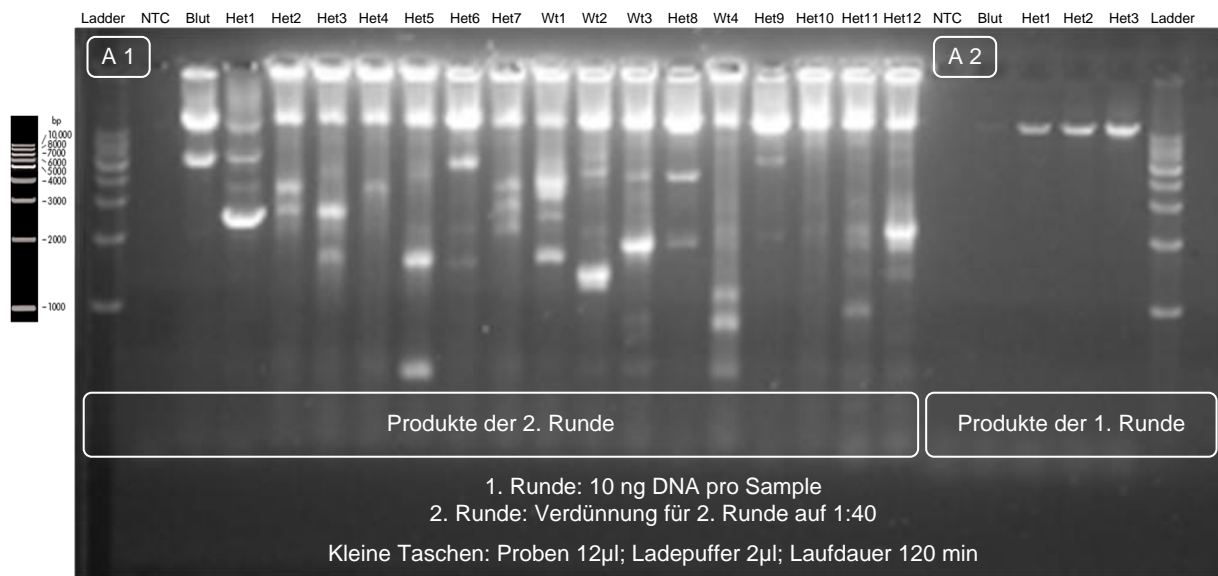


Abbildung 30 (Bild A1 und A2): Ergebnisse der long PCR (DNA aus Herzhomogenat von älteren Tieren)

Insgesamt wirkten die Banden etwas „schmierig“, als Ausdruck einer zu starken Konzentration. Deshalb wurden, zur Optimierung des optischen Ergebnisses, noch zwei Verdünnungsexperimente angeschlossen (Abbildung 31). Zum einen wurden die Produkte der ersten Runde für die zweite Runde nicht nur 1:40 sondern 1:160 verdünnt (Abbildung 31, B2). Zum anderen wurden Produkte der zweiten Runde selbst aus dem ersten Versuch auf 1:4 verdünnt und anschließend erneut auf ein Gel aufgetragen. (Abbildung 31, B1)

Mit der zweiten Variante ließ sich das bessere Ergebnis erzielen: Die Banden kamen jetzt scharf abgegrenzt und sehr differenziert zur Darstellung.

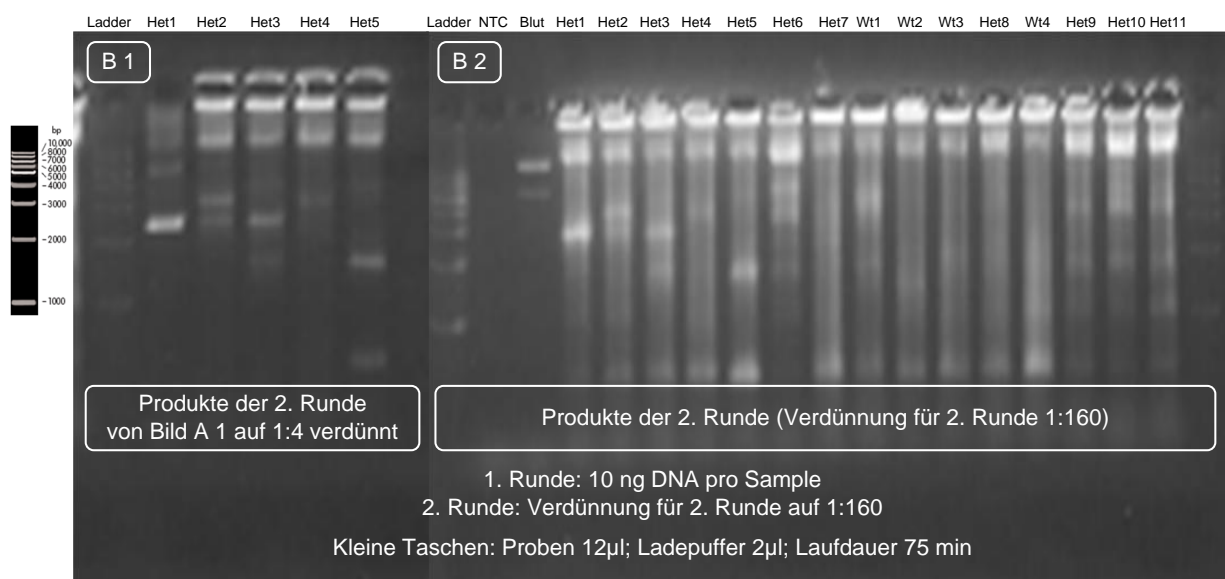


Abbildung 31 (Bild B1): Verdünnungsexperiment 1 zu Abb. 16 Bild A1 (Endprodukte verdünnt); (Bild B2): Verdünnungsexperiment 2 zu Abb. 16 Bild A1 (Produkte der 1. Runde stärker verdünnt)

5. Diskussion

5.1. Genotypisierung mittels realtime PCR

5.1.2. Ergebnis der Genotypisierung mittels realtime PCR

Das Ergebnis wich mit 21,35% für Wildtypen, 70,77% für Heterozygote und 7,87% für homozygote Knock-outs deutlich von der nach den Mendelschen Regeln erwarteten Verteilung von 1:2:1 ab. Es kann nur darüber spekuliert werden, dass moderater oxidativer Stress - der bei heterozygoten Tieren zu erwarten wäre - ein Selektionsvorteil bedeutet. Die Tatsache, dass die Zahl der Knock-Outs den Wildtypen deutlich unterlegen ist, liefert möglicherweise einen Hinweis dafür, dass totale SOD2-Defizienz bereits in utero nicht mit dem Leben zu vereinbaren ist. Das Ergebnis ist abweichend von der in der Literatur publizierten Verteilung von 1:2:1 (*Lebovitz R., 1996*).

5.1.1. Methodik der Genotypisierung mittels realtime PCR

Insgesamt hat sich die Genotypisierung mittels realtime PCR in der vorliegenden Arbeit bewährt. Sie wurde bewusst als Alternative zur herkömmlichen Genotypisierung mittels Standard PCR gewählt. Sie zeichnete sich durch reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse aus. Die Methode der realtime PCR wurde auch für andere Untersuchungen etabliert. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die unterschiedlichen Messungen miteinander zu kombinieren, so dass aus einer Probe gleichzeitig sowohl der Genotyp als auch die Anzahl der Kopien bzw. der Deletionsgrad bestimmt werden kann.

5.2. Homogenatsuntersuchungen

Sowohl die Deletionsbestimmungen als auch die Messung der Kopienanzahl wurden auch auf Homogenatsebene durchgeführt. Zum einen um organspezifische Unterschiede auszumachen, zum anderen zum Vergleich der Ergebnisse auf Einzelzellebene.

5.2.1. Deletionen in der mtDNA

Über einen Kausalzusammenhang zwischen oxidativem Stress und Δ mtDNA wird seit langem spekuliert (*Miquel J, 1980; 1991; Harmann D, 1983*). Zur Klärung der Frage bietet sich das SOD2-KO-Mausmodell an, das durch ein hohes Maß an endogenem oxidativen Stress selektiv in den Mitochondrien gekennzeichnet ist. Gegenüber humanem Gewebe hat dieser Ansatz allerdings den Nachteil, dass für murine mtDNA bis jetzt keine Methode etabliert ist, die die quantitative Erfassung sämtlicher Δ mtDNA zulässt. Für menschliche mtDNA ist die ND1/ND4-Methode zur quantitativen Δ mtDNA gut etabliert (*He L, 2002; Krishnan KJ, 2007a*). Die Messung von Δ mtDNA im SOD2-Mausmodell erfordert die Verfügbarkeit entsprechender Methoden. Zwar ist die long PCR als Methode zur Darstellung von Δ mtDNA seit längerem (*Melov S, 1999*) für murine mtDNA gut etabliert, allerdings können mit dieser Methode Δ mtDNA nicht quantifiziert werden. Nachdem allerdings ein Kausalzusammenhang zwischen oxidativem Stress und Δ mtDNA vermutet wird, ist die quantitative Komponente

essentiell, da man einen dosisabhängigen Effekt je nach SOD2-Genotyp erwarten würde. Dementsprechend stand die Etablierung einer adäquaten Methode an vorderster Stelle.

5.2.1.1. Realtime PCR

Das Prinzip der humanen ND1/ND4-Methode zur Quantifizierung von Δ mtDNA beruht auf der Beobachtung, dass Δ mtDNA bevorzugt im „major arc“ (hier liegt ND4) auftreten, wohingegen der „minor arc“ (hier liegt ND1) kaum von Δ mtDNA betroffen ist. Aus dem Verhältnis der zwei mitochondrialen Gene zueinander kann auf den Deletionsgrad geschlossen werden (He L, 2002; Krishnan KJ, 2007a).

Inwieweit diese Beobachtung auch für murine mtDNA zutrifft, war bisher nicht bekannt. Nach dem Prinzip „try and error“ wurde diese Methode auf die murine mtDNA übertragen. Hierfür wurden sequenzspezifische Primer und Probes für Maus-mtDNA entwickelt. Der restliche Ansatz erfolgte in Analogie zu der humanen ND1/ND4-Methode. Rein technisch funktionierte der Ansatz hervorragend. Es zeigte sich allerdings bei der Untersuchung von DNA aus Gewebehomogenaten, dass sowohl ND1 als auch ND4 partiell vermindert waren. Dies spricht dafür, dass Δ mtDNA bei der Maus in beiden Regionen (major und minor arc) auftreten. Dementsprechend wurde die Methode weiterentwickelt.

Unter der Annahme, dass murine Δ mtDNA gleichmäßiger verteilt als beim Menschen auf dem ringförmigen mtDNA-Molekül auftreten, wurden drei mitochondriale Gene (ND1, COX3, CytB) ausgewählt, die in etwa gleichem Abstand zueinander liegen. Für diese wurden ebenso sequenzspezifische Primer/Probe-Assays entwickelt. Die Standardkurven sprachen für hohe technische und methodische Präzision.

Liegen keine Δ mtDNA vor, würde man für die drei Gene ein Mengenverhältnis von 1:1:1 erwarten. Abweichungen hiervon sprechen für Deletionen. Über die genaue Bestimmung der Differenzen und nach Normalisierung der Werte mittels einer Standard-DNA konnten so die Deletionsgrade gemessen werden.

5.2.1.1.2. Ergebnisse der Deletionsuntersuchungen mittels realtime PCR

In der Gruppe der Neugeborenen waren bei den hetero- und homozygoten SOD2-KO-Mäusen im Herzmuskel – aber nicht im Gehirn – eine höhere Δ mtDNA-Belastung als bei den Wildtypen nachweisbar. Dies legt den Schluss nahe, dass in Folge der SOD2-Defizienz bereits in utero Δ mtDNA akkumulieren.

Entsprechend früherer Beobachtung zeigte sich bei den Wildtypen sowohl im Herz als auch im Gehirn das Phänomen der Zunahme der Deletionsbelastung bei älteren Tieren im Vergleich zu den Neugeborenen. Dieser Effekt war bei den Heterozygoten nicht nachweisbar. Es konnte bei den Wildtyp-Mäusen also eine zeitliche Dynamik analog zu den Beobachtungen am Menschen nachgewiesen werden, so dass die Maus prinzipiell als Modell für humane molekulare, mitochondriale Alterungsprozesse geeignet erscheint.

Während bei den Neugeborenen nur Gehirn- und Herzhomogenat untersucht wurden, erfolgte bei der Gruppe der älteren Tiere zusätzlich Untersuchungen der DNA aus Leber- bzw. Muskelhomogenat. Nach einem Jahr war im Herz und im Gehirn kein Unterschied mehr bei der Δ mtDNA-Belastung zwischen SOD2-defizienten Tieren und Wildtypen nachweisbar. D.h. oxidativer Stress führt lediglich initial - in utero – zu einer steigenden Deletionsbelastung. Im Verlauf wird dieser Effekt mutmaßlich durch entsprechende reaktive Veränderungen maskiert, so dass in Hinblick auf die ursprüngliche Hypothese eine differenzierte Beurteilung erforderlich erscheint. Offenbar verfügt die Zelle über effektive Kompensationsmechanismen, die trotz SOD2-Defizienz, die Rate an Δ mtDNA konstant hält. Die biologische Relevanz der

Deletionen kann damit anhand der erhobenen experimentellen Daten nicht abschließend beurteilt werden.

Auffallend war zudem, dass mtDNA der Leber kontinuierlich die höchste Deletionsbelastung aufwies. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass für das Organ wohl auch relativ hohe Deletionsgrade ohne funktionelle Relevanz bleiben.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf die Komplexität des SOD2-Mausmodells hin. Zum einen existieren genetische Modifikatoren der SOD2. Zum anderen ist die SOD2-Funktion offenbar viel differenzierter und komplexer als anfangs angenommen (*Huang TT 2001; 2006*). Darüber hinaus stößt das SOD2-Mausmodell an eine der Grenzen der Mitochondrialen Theorie des Alterns: Die Lebensspanne der SOD2^{+/-}-Mäuse ist nicht vermindert (*Van Remmen H, 1999; 2003*). Die Mitochondriale Theorie des Alterns wurde in den vergangenen Dekaden über verschiedene Ansätze extensiv überprüft (*Harmann D, 1983; Linnane AW, 1989; Wei YH, 1992; Miquel J 1980,1991; Lin MT, 2006*). Eine weitere Fortentwicklung und Modifikation erscheint notwendig, zumal die Kausalzusammenhänge offenbar weniger stringent sind als bisher angenommen.

Es war keine signifikante positive Korrelation zwischen erhöhter Kopienanzahl und der Deletionsbelastung feststellbar. Offenbar geht oxidativer Stress nicht zwangsläufig mit höheren Deletionswerten einher. Die organ- und altersspezifischen Ergebnisse weisen erneut auf die Selektivität bestimmter Effekte hin. Während bei den Neugeborenen für Herz und Gehirn bzw. bei den einjährigen Tieren für Muskel und Leber eine schwach positive Korrelation nachweisbar war, ergab sich bei den einjährigen Tieren für das Gehirn kein linearer Zusammenhang und für das Herz eine schwach negative Korrelation.

5.2.1.1.1. Methodik der realtime PCR

Die Aussagekraft der realtime PCR steht und fällt mit der methodischen Optimierung. V.a. bei der Anwendung von komparativen Methoden müssen bestimmte Bedingungen zwingend erfüllt sein:

Zum einen ist die Effizienz R^2 der Reaktionen (mathematisch ausgedrückt über die Steigung m der Standardkurven) entscheidend: Sie muss für alle drei Gene annähernd gleiche Werte einnehmen.

Zum anderen ist eine präzise Arbeitsweise essentiell: Im Gegensatz zur humanen ND1/ND4-Methode handelt es sich bei der neu entwickelten Methode nicht um einen Multiplex-, sondern um einen Singleplex-Ansatz. D.h. die verschiedenen Gene werden in verschiedenen Wells gemessen. Dementsprechend muss auch ein DNA-Sample je Messung dreifach pipettiert werden. Neben dem zusätzlichen Materialaufwand bedeutet dies ein potentiell höheres Risiko für Pipettierungenauigkeiten, die letztlich zu falsch hohen Deletionswerten führen könnten. Rein technisch ist bei dieser Methode kein Multiplex-Ansatz möglich, da pro Well maximal nur zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden können. Würde man Probes mit dem gleichen Farbstoff innerhalb eines Wells einsetzen, wäre eine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Genen nicht mehr möglich.

Die Anforderungen an die Effizienz konnten über die Etablierung entsprechender Standardkurven gewährleistet werden.

Die Methode erwies sich sowohl beim Pipettieren von Triplikaten innerhalb einer Platte als auch beim Pipettieren eines Samples in Triplikaten auf verschiedenen Platten als reliabel.

Wie bereits angedeutet, handelt es sich bei der Berechnungsmethode um eine rein komparative Methode ohne ein festes Referenzgen. Sind alle drei Gene gleichmäßig von Δ mtDNA betroffen, könnte dies zu einer falsch niedrigen Einschätzung der tatsächlichen Deletionsbelastung führen, da Grundlage der Deletionsberechnung nicht der absolute Wert, sondern nur die Differenz der drei Gene zueinander ist. Allerdings implizieren die Ergebnisse

der Arbeit, dass eine stochastische Normalverteilung für Δ mtDNA eher unwahrscheinlich ist. Zwar traten in der murinen mtDNA auch Δ mtDNA im „minor arc“ (hier ist ND1 lokalisiert) auf, allerdings waren diesen den Δ mtDNA im „major arc“ (hier sind COX3 und CytB lokalisiert) zahlenmäßig deutlich unterlegen. Offenbar besteht doch in Analogie zur humanen mtDNA eine Präferenz für Δ mtDNA im „major arc“, wenn auch nicht ganz so deutlich ausgeprägt. Im Umkehrschluss heißt das auch, dass selbst wenn ND1 deutlich weniger von Δ mtDNA betroffen ist, dies nicht zu falsch niedrigen Deletionswerten führt, da in die Berechnung jeweils das maximal deletierte Gen eingeht. Im Gegenteil: Niedrige Deletionsgrade würden die Differenz zum maximal deletierten Gen erhöhen und damit zu einer realistischen Einschätzung der Deletionsgrade führen.

Ein anderer Kritikpunkt der Methode liegt in der Tatsache begründet, dass Δ mtDNA, die zwischen den drei Genen auftreten, nicht erfasst werden. Andererseits gibt es keine Hinweise darauf, dass in den drei ausgewählten Genen mit Ausnahme von ND1 seltener Δ mtDNA auftreten, als in den Bereichen dazwischen. Insofern ist die Auswahl der drei Gene relativ beliebig, solange sie das Kriterium erfüllen möglichst gleichmäßig verteilt auf dem ringförmigen mtDNA-Molekül zu liegen, so dass drei Abschnitte repräsentiert werden. Theoretisch könnte man Δ mtDNA auch „feinmaschiger“ quantitativ erfassen, in dem man mehr als drei mitochondriale Gene misst. Allerdings bedeutet dies neben dem zusätzlichen Material- und Arbeitsaufwand auch das zusätzlich erhöhte Risiko für Pipettierungsungenauigkeiten. Die möglichen Auswirkungen einer niedrigeren Deletionsquote für ND1 wurden bereits besprochen. Insgesamt wird mit der Methode der Deletionsgrad eher unterschätzt. Nichtsdestotrotz ist sie geeignet, um das Ausmaß an Δ mtDNA abzuschätzen.

5.2.1.2. Nested long PCR

5.2.1.2.1. Ergebnisse der Deletionsuntersuchungen mittels nested long PCR

Mittels nested long PCR konnten multiple Deletionen in diversen Organen, bei jungen und bei alten Mäusen und bei sämtlichen Genotypen nachgewiesen werden. Insgesamt handelt es sich offenbar um recht unspezifische Veränderungen. Bekannterweise neigen Mäuse (im Vergleich zu Menschen) zu einer höheren und schnelleren Mutationsrate. Dementsprechend können Mäuse trotz ihrer relativ kurzen Lebensspanne in relevantem Ausmaß Δ mtDNA akkumulieren (Wang E, 1997). Ebenso ist bekannt, dass steigendes Lebensalter bei Maus und Mensch mit zunehmender Deletionsbelastung vergesellschaftet ist (Perez-Campo R, 1998). Insgesamt belegen die Ergebnisse die erfolgreiche Optimierung einer Methode zur qualitativen Darstellung von Δ mtDNA in murinem Gewebe.

Besonders intensiv wurde die DNA aus Herzgewebe bei den älteren Tieren untersucht. Zum einen weil in dieser Alterklasse bei heterozygoten SOD2-Mäusen ein signifikanter Anstieg der mtDNA-Kopienanzahl nachgewiesen werden konnte und zum anderen, weil die SOD2-Aktivität unter physiologischen Bedingungen (also bei SOD^{+/+}) im Herzen die höchste Aktivität aufweist (Li Y, 1995). Die reaktive Erhöhung der Kopienanzahl kann als Stressantwort der Zelle gewertet werden und spricht dafür, dass die SOD2-Defizienz für Herzzellen besonders relevant ist, zumal in anderen Organen keine entsprechenden Veränderungen festgestellt werden konnten. Folglich dürfte die Belastung durch ROS in Herzen von SOD^{+/-}-Mäusen besonders hoch sein. Im Einklang zur mitochondrialen Theorie des Alterns müsste man - bedingt durch die erhöhten ROS-Konzentrationen - einen deutlichen Unterschied der Deletionsbelastung zwischen heterozygoten und Wildtyp-Mäusen der gleichen Altersklasse sehen (Miquel J, 1980; 1991; Harmann D, 1983). Entgegen der postulierten These zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den zwei Gruppen. Andererseits muss betont werden, dass die Methode in keiner Weise quantitativ ist. Auf Grund der hohen Sensitivität rei-

chen schon wenige Kopien an Δ mtDNA aus, um ausreichend amplifiziert zu werden, so dass die Δ mtDNA als Bande zur Darstellung kommt. Umgekehrt ist bekannt, dass Δ mtDNA erst ab einem relativ hohen Schwellenwert von ca. 70% funktionell relevant werden (*Sciaccio M, 1994; Bender A, 2006*). D.h. der Nachweis von Δ mtDNA im Homogenat kann durchaus irrelevant sein, da Δ mtDNA für lange Zeit - mitunter auch für unbestimmte Zeit- klinisch stumm bleiben. Insofern kann aus dem qualitativen Nachweis von Δ mtDNA nicht auf eine zelluläre Beeinträchtigung geschlossen werden.

5.2.1.2.2. Methodik der nested long PCR

Ursprünglich erhielt die Methode Einzug in die mitochondriale Forschung, um eine alterungsbedingte Zunahme an Δ mtDNA im Maushirn und anderen Organen darzustellen (*Melov S, 1997*). Gut zehn Jahre später weiß man um die Grenzen der Methode: Sie ist nicht quantitativ und erlaubt damit keine Aussage über die funktionelle Relevanz der Δ mtDNA (*Bender A, 2006*). Dennoch stellt die long PCR ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung der mtDNA dar. Sie zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, annähernd das gesamte Mitom mit ca. 16kbp amplifizieren zu können. Stellt sich beim Nachweis der PCR-Produkte lediglich die Wildtypbande dar, spricht das für die volle Integrität des Mitoms. Zugleich dient der Nachweis der Wildtypbande als Bestätigung einer suffizienten Amplifikation. Weitere Banden können als Hinweise auf Δ mtDNA gewertet werden. Ggf. können diese Banden ausgeschnitten werden und zur weiteren Charakterisierung sequenziert werden. D.h. die long PCR bietet sich als Screeninguntersuchung zur Identifizierung unterschiedlicher Δ mtDNA an. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass Δ mtDNA auf dem ringförmigen mtDNA-Molekül nicht stochastisch normalverteilt, sondern an Prädilektionsstellen („breakpoints“) mit repetitiven Sequenzen auftreten (*Reeve AK, 2008b*).

Insgesamt eignet sich die long PCR eher als Folgeexperiment der realtime PCR: Wenn in der realtime PCR relevante Deletionsgrade gemessen wurden, können die Δ mtDNA mittels long PCR qualitativ dargestellt werden und ggf. durch Ausschneiden der Bande näher untersucht werden. Umgekehrt ist der bloße Nachweis von Δ mtDNA in der long PCR nicht aussagekräftig. In Analogie dazu stellt der Nachweis von Δ mtDNA in der long PCR bei unauffälligen Deletionsgraden in der realtime PCR keinen Widerspruch dar, da die Methode keine Aussage über die Quantität erlaubt. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Darstellung der Wildtypbande mitunter Schwierigkeiten bereitet: Bekanntermaßen werden kleine DNA-Fragmente (Δ mtDNA!) im Vergleich zu größeren Stücken (Wildtyp-mtDNA) bevorzugt amplifiziert (*Schriner SE, 2005*). Insofern lässt die Absenz der Wildtypbande nicht den Schluss zu, dass in der Probe keine Wildtyp-Kopien vorhanden waren.

5.2.3. Kopienanzahl der mtDNA

Bei der Kopieanzahlsbestimmung mittels realtime PCR ist folgendes Ergebnis hervorzuheben: In der Gruppe der älteren Tieren zeigten die Untersuchungen der DNA aus Herzhomogenat bei den Heterozygoten im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant höhere Kopienanzahl. Dieses Phänomen ließ sich weder bei der Gruppe der Neugeborenen noch in der Gruppe der älteren in anderen Gewebekomogenaten nachweisen.

5.2.3.2. Ergebnis der Kopienanzahlbestimmung mittels realtime PCR

Pathologische Veränderungen der Mitochondrien können sowohl mit mtDNA-Depletion als auch mit -Überproliferation vergesellschaftet sein. Insofern bietet sich die Messung der mtDNA als aussagekräftiger Parameter zur Beurteilung reaktiver Veränderungen an.

Die Ergebnisse belegen einen signifikanten Anstieg der mtDNA-Kopienanzahl selektiv in Herzen älterer heterozygoter Tiere. Zunächst soll auf den reaktiven Anstieg der Kopienanzahl eingegangen werden. Danach werden die Gründe für die Selektivität des Effektes (Organ, Alter, Genotyp) diskutiert.

Im Abschnitt 1.3.2.3. wurden bereits ausführlich die Mechanismen der Biogenese von Mitochondrien und mtDNA dargestellt. Das Phänomen der mtDNA-Überproliferation im SOD^{+/-}-Mausmodell kann folgendermaßen interpretiert werden:

Mitochondrien sind der wichtigste Energielieferant der Zelle. Sie stellen den Großteil an ATP zur Verfügung. Kommt es im Rahmen des Alterungsprozesses oder nach Exposition von exogenen Stressoren zu einem Funktionsabfall der Mitochondrien, ist die eventuell schon geschädigte Zelle angehalten, darauf zu reagieren. SOD^{+/-}-Mäuse leiden nachweislich unter erhöhtem endogenen oxidativen Stress (*Williams MD, 1998; VanRemmen H, 2003*). Zudem konnten etliche mitochondriale biochemische Defekte als Ausdruck einer mitochondrialen Funktionsstörung nachgewiesen werden (*Li Y, 1995; Lebovitz RM, 1996; Melov S, 1999; Hinerfeld D, 2004*). Das Phänomen eines Anstieges der mtDNA-Kopienanzahl in Assoziation mit erhöhtem oxidativen Stress konnte auch bei alternden Ratten, Mäusen und bei Greisen in verschiedenen Organgeweben beobachtet werden (*Gadaleta MN, 1992; Barrientos A, 1997a/b; Pesce V, 2001*).

Um eine ausreichende Energieversorgung für Reparatur und Schadensbeseitigung zu gewährleisten, werden Signale z.B. in Form von H₂O₂ zum Nukleus gesendet, welche kompensatorisch die Proliferation von Mitochondrien und mtDNA stimulieren. Oxidativer Stress ist ein etablierter Stimulus der mtDNA-Proliferation (*Lee HC, 2005*). Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über wichtige Signalkaskaden. Folgendes Beispiel unterstreicht die Wirksamkeit der Signalkaskaden für eine suffizienten Energieversorgung: Jüngst konnte in einer Arbeit am Mausmodell für mitochondriale Myopathien gezeigt werden, dass die Aktivierung des PPAR/PGC-1 α -Pathways bioenergetischen Defiziten vorbeugt und zugleich den Phänotyp einer mitochondrialen Myopathie effektiv verbessert (*Wenz T, 2008*).

Im Falle einer effizienten Schadensbehebung könnte die Zelle wieder in das reguläre Wachstum eintreten. Die kompensatorische Hochregulation der mtDNA leistet hierfür einen wichtigen Beitrag. Lange bestehender oder schwerwiegender Schaden hingegen überfordert die Reparaturkapazitäten der Zelle. Offenbar sind Mitochondrien in der Lage, die Erschöpfung des Reparatursystems zu registrieren. Weiter initiieren sie unter Einbeziehung von extrazellulärem Stress oder extramitochondrialem Stress und Signalen irreversibel den Prozess der Apoptose (*Lee HC, 2005*). Entsprechende Beobachtungen wurden auch im Gehirn und partiell auch im Herzen von wenigen Tagen alten SOD^{+/-}-Mäusen gemacht: Ultrastrukturell imponierte zellulärer Schaden mit mitochondrialer Beeinträchtigung, Polysomenverlusten und Räumung des Zytoplasmas, der letztlich zum Zellverlust führte (*Lebovitz RM, 1996*). In einer anderen Arbeit resultierte der erhöhte oxidative Stress in SOD^{+/-}-Mäusen in einem altersabhängigen Verschleiß der Mitochondrien bis hin zur Eskalation in gesteigerter Apoptose (*Kokoszka JE, 2000*).

Trotz der positiven aktivierenden Effekte im Hinblick auf Mitochondrienzahl darf nicht übersehen werden, dass oxidativer Stress die ROS-Produktion in betroffenen Zellen beschleunigt. Der „Netto-Effekt“ ist offenbar dosisabhängig. Milder oxidativer Stress kann die Zahl der Mitochondrien bzw. der mtDNA-Moleküle steigern. Persistierender oxidativer Stress jedoch führt zu schwerer oxidativer Schädigung der Zelle und begünstigt damit krankhafte Prozesse.

Wie das SOD2^{-/-}-Mausmodell belegt, endet oxidativer Stress nach Erschöpfung der Abwehrmechanismen bereits postnatal letal.

Darüber hinaus sollte berücksichtigt werden, dass Zahl der mtDNA-Kopien an sich kein Garant für eine suffiziente Energieversorgung sind. Wesentliche Rolle spielt neben der Quantität auch die Qualität der Mitochondrien. Diese spiegelt sich nicht nur im Deletionsgrad wider. Insofern schließt der fehlende Unterschied in der Deletionsbelastung zwischen Herzen von SOD2-defizienten Mäusen und Wildtypen, eine mindere Qualität der stress-induzierten Mitochondrien nicht aus.

Ein reaktiver Anstieg der mtDNA-Kopienanzahl im Vergleich zu Wildtypen konnte weder in Herzen von neugeborenen SOD2^{+/-}- bzw. SOD2^{-/-}-Mäusen noch in anderen Organen festgestellt werden. Die Tatsache, dass bei älteren Wildtyp-Tieren keine entsprechenden Veränderungen gemessen werden konnten, legt die Vermutung nahe, dass die partielle SOD2-Defizienz und der damit einhergehende erhöhte endogene Stress für den Effekt verantwortlich sind. Andererseits würde man bei Genotypen mit totaler SOD2-Defizienz einen mindestens genauso starken Effekt erwarten. Dies war bei den neugeborenen SOD2^{-/-}-Mäusen jedoch nicht der Fall. Hier kommt mutmaßlich die zeitliche Komponente zum Tragen: Die fehlenden Veränderungen bei neugeborenen SOD2^{+/-}-Mäusen belegen, dass die reaktiven Veränderungen erst nach einer gewissen Zeit auftreten. Mutmaßlich dann, wenn der oxidative Stress relevante Ausmaße angenommen hat. Unter dem Gesichtspunkt hätten die neugeborenen SOD2^{-/-}-Mäuse einen „Vorsprung“ hinsichtlich der Belastung. Dennoch weisen sie keine Veränderungen auf. Eine mögliche Erklärung liefert ein protektiver Effekt der Kombination aus niedriger O₂-Spannung und einem oxidativen Metabolismus auf relativ niedrigem Niveau in Utero. Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass in utero bei Nagetieren und Primaten die SOD2-Levels bis relativ spät in der Schwangerschaft sehr niedrig sind (*Allen RG, 1991; Frank L, 1991*). Perinatal kommt es zu einem rapiden Anstieg der O₂-Belastung. Für die antioxidative Bewältigung der Geburtshyperoxie ist Vitamin C hauptverantwortlich (*Sotiriou S, 2002*); d.h. die SOD2-Defizienz reicht hier nicht übermäßig zum Nachteil. Offenbar hat die Lebensspanne der Tiere (die Tiere wurden unmittelbar nach der Geburt getötet) nicht ausgereicht, um eine relevante Dosiswirkung zu beobachten. Alternativ ist das Ausmaß des oxidativen Stresses perinatal bereits relevant, jedoch beruhen die reaktiven Veränderung auf dem relativ langsamen (im Bereich von Tagen) Prozess der Genexpression, so dass die entsprechenden Stimuli zwar gesendet werden, aber nicht mehr zum Tragen kommen.

Der massive kardiologische Phänotyp sämtlicher (*Li Y, 1995*) bzw. einiger (*Lebovitz RM, 1996*) neugeborenen SOD2^{-/-}-Mäuse belegt bereits die fatalen Folgen der totalen SOD2-Defizienz für das Herz. Offenbar ist die antioxidative Abwehr durch die SOD2 für dieses Organ besonders wichtig. Untersuchungen an SOD2^{+/-}-Mäusen belegen, dass die SOD2-Konzentrationen des Herzens im Vergleich zu anderen stoffwechselaktiven Geweben (Gehirn, Leber, Niere) bei weitem die höchsten Konzentrationen aufweist. In Relation zur Nummer zwei der Rangliste (dem Gehirn), liegt die SOD2-Konzentration um den Faktor 5,9 höher! Zudem ist bekannt, dass die Herz-SOD2-Aktivität im Alter bei SOD2^{+/-}-Mäusen leicht ansteigt (*Van Remmen H, 2003*). Offenbar erfordern bestimmte Veränderungen im Alter ein höheres Maß an oxidativer Abwehr. Bei den SOD2^{+/-}-Mäusen wurde dagegen eine Stagnation der Aktivität beobachtet (*Van Remmen H, 2003*). Zudem zeigten sich bei SOD2^{+/-}-Mäusen Veränderungen der kardialen mitochondrialen Funktionen sowie eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose. Die mitochondriale Dysfunktion äußerte sich durch eine verminderte Atmung über Komplex I und einer erhöhten Induktion der mtMPT durch Ca²⁺ und andere Stressoren. Nach dem Auslösen der Apoptose konnten auch erhöhte Cyt-c-Konzentrationen gemessen werden. In Assoziation zur mitochondrialen Dysfunktion wurden auch Indizien für erhöhten mitochondrialen Schaden, wie der verminderten Aktivität von Fe-S-Cluster-haltigen Enzymen (z.B. Aconitase), gefunden (*Van Remmen H, 2001*). Die Daten belegen die besondere Vulnerabilität des Herzens gegenüber dem erhöhten oxidativen Stress.

Andererseits ist erhöhter oxidativer Stress im Rahmen des SOD2-KO-Modells auch für andere Organe gut belegt. Offenbar ist es eine Frage der Dosis. Unterhalb eines Schwellenwertes führt der oxidative Stress zu keinem proliferativen Effekt. Möglicherweise spielt nicht die Dosis des oxidativen Stresses selbst, sondern seine Auswirkungen die entscheidende Rolle. Dementsprechend könnte man darüber spekulieren, dass andere Organe über bessere kompensatorische Strategien jenseits der SOD2-Aktivität verfügen, um den oxidativen Stress im Rahmen zu halten. Insofern wäre es nur konsequent, die reaktiven Veränderungen des Herzens weniger als erhöhte Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress, sondern vielmehr als erhöhte Vulnerabilität gegenüber SOD2-Defizienz zu interpretieren. Insgesamt können drei verschiedene Risikofaktoren ausgemacht werden, die zu den reaktiven Veränderungen geführt haben:

- (1) Der Genotyp: Die partielle SOD2-Defizienz bedingt erhöhten endogenen Stress
- (2) Das Alter: Offenbar erreicht der oxidative Stress erst im zeitlichen Verlauf relevante Ausmaße
- (3) Das Organ: Das Herz weist eine besondere Vulnerabilität gegenüber SOD2-Defizienz auf

Die erhöhte Kopienanzahl kann als Reaktion auf die partielle SOD2-Defizienz gewertet werden. Wie bereits unter 1.3.5.3.3. ausführlich dargestellt, wird bei erhöhtem oxidativen Stress bzw. partieller SOD2-Defizienz die Zahl der Mitochondrien und auch die der mtDNA-Moleküle hochreguliert. Darüber hinaus sind etliche Stressoren bekannt, die einen ähnlichen Effekt haben. Hierbei dürfte v.a. der erhöhte oxidative Stress eine wesentliche Rolle spielen. Letztlich könnte die erhöhte Kopienanzahl Ausdruck einer Anpassungsreaktion sein. Einer dieser Stressoren ist das Alter (*Gadaleta M, 1992; Barrientos A, 1997a. b; Lee HC, 1998; Pesce V, 2001*): Bei allen untersuchten Genotypen konnte eine erhebliche Steigerung der mtDNA-Kopienanzahl nachgewiesen werden. Offenbar ist der Anstieg der mtDNA in alternem Gewebe Resultat eines Rückkopplungsmechanismus zum Ausgleich der defekten Mitochondrien mit beschädigter ETC oder mutierter mtDNA, um eine suffiziente Energieversorgung der Zelle weiterhin zu gewährleisten (*Lee HC, 2000b*).

Dennoch bleiben zwei Fragen offen: Zum einen, warum ist der Effekt nicht in der Gruppe der Neugeborenen nachweisbar? Und zum anderen, warum ist der Effekt in der Gruppe der älteren Tiere nur selektiv im Herzen nachweisbar, nicht jedoch in anderen ebenso stark energieabhängigen Organen wie Gehirn, Leber und Muskel?

Zur ersten Frage: Bekanntermaßen ist die O₂-Spannung und damit das Ausmaß an oxidativen Stress in utero deutlich niedriger als postpartal, so dass möglicherweise der Effekt selbst bei totaler SOD2-Defizienz noch nicht zum Tragen kommt. Mit der Geburt kommt es zu einem rapiden Anstieg der O₂-Spannung, allerdings beruht die Hochregulation der Kopienanzahl auf Prozessen die mitunter Tage in Anspruch nehmen, so dass die Hochregulation bei Neugeborenen mit SOD2-Defizienz zwar eventuell in die Wege geleitet wird, aber aus zeitlichen Gründen nicht mehr zum Tragen kommt. D.h. bevor der Effekt nachweisbar wäre, sind die Tiere bereits gestorben bzw. getötet.

Zur zweiten Frage: Bei sämtlichen untersuchten Organen handelt es sich um stoffwechselaktive und damit stark energiebedürftige Gewebe. Insofern wäre anzunehmen, dass SOD2-Defizienz bei dieser Gruppe jeweils einen ähnlichen Effekt auslöst. Eine Erklärung, warum nur selektiv das Herz betroffen ist, liefert möglicherweise die Tatsache, dass im Herzen die höchste SOD2-Aktivität nachweisbar ist. Insofern erscheint es auch plausibel, dass eine partielle SOD2-Defizienz in diesem Organ auch die größte Auswirkung hat. Bei den anderen Organen lässt sich auch kein graduierter Effekt nachweisen. Das lässt möglicherweise den Schluss zu, dass die SOD2-Defizienz in diesen Organen ohne funktionelle Relevanz ist oder,

alternativ, dass der Effekt dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip gehorcht und das Ausmaß an SOD2-Defizienz nicht groß genug ist, diesen Effekt auszulösen.

5.2.3.1. Methodik der Kopienanzahlmessung

Die Messung der Kopienanzahl erfolgte gleichzeitig zur Messung der Deletionsbelastung mittels realtime PCR. Ähnlich der Methode zur Berechnung der Deletionsgrade handelt es sich auch hier um eine komparative Methode. Dementsprechend können keine absoluten Werte bestimmt werden, sondern nur relative. Grundprinzip ist die parallele Messung eines nukleären Referenzgens (ACTB) und eines mitochondrialen Gens. Während das nukleäre Gen pro Zelle konstant diploid vorliegt, ist die Anzahl des mitochondrialen Gens variabel. Aus dem Verhältnis der Gene zueinander in Relation zu einer Standard-DNA kann auf die relative Kopienanzahl geschlossen werden. Häufig wurde für die DNA aus Homogenaten eine vielfache Kopienanzahl in Relation zur Standard-DNA gemessen. Dies verwundert kaum, wenn man sich vor Augen hält, dass die Standard-DNA aus Blut gewonnen wurde. Dieses enthält deutlich weniger Mitochondrien als stoffwechselaktive Gewebe wie Leber oder Herz, die für ihr Mitochondrienreichtum bekannt sind. Aussagekräftig werden die Werte erst durch die Messung verschiedener Organe innerhalb desselben Individuums und durch die Messung desselben Organs innerhalb unterschiedlicher Individuen. Die erste Option gibt Aufschluss über das Verteilungsmuster der Mitochondrien innerhalb eines Individuums; sie erlaubt aber keine Aussage, ob eine erhöhte, normale oder verminderte Kopienanzahl vorliegt. Die zweite Option erlaubt die Einschätzung, ob die Kopienanzahl in Relation zur Vergleichsgruppe erhöht oder vermindert ist. Insofern wurden die erhobenen Daten erst in der Zusammenschau interessant: Zum einen konnten organspezifische Werte identifiziert werden, zum anderen konnten innerhalb eines Individuums in einzelnen Organen Veränderungen der Kopienanzahl festgestellt werden. Wie die Daten belegen, ist die Methode geeignet, um reaktive Veränderungen innerhalb einer Gruppe auszumachen. Für die Messung einer einzelnen Probe ist die Methode nicht geeignet.

Auch unter technischen Aspekten hat sich die Methode bewährt. Entsprechend der realtime PCR zur Deletionsbestimmung funktionierte auch die Messung des nukleären Gens sehr gut. Die Kombination der zwei Methoden hat den Vorteil, dass Synergien genutzt werden können: Für die Messung der Kopienanzahl muss kein zusätzliches (mitochondriales) Gen gemessen werden und die Messung dreier mitochondrialer Gene erhöht die Validität der Methode zur Kopienanzahlbestimmung. Sollte eines der mitochondrialen Gene von Δ mtDNA betroffen sein, könnte dies zu falsch niedrigen Werten der Kopienanzahl führen. Nachdem aber für die Berechnung dasjenige ausgewählt wird, dass in der höchsten Konzentration vorliegt, wird das Risiko einer Verfälschung minimiert, da es unwahrscheinlich ist, dass innerhalb einer Probe alle drei Gene signifikante Deletionsgrade aufweisen. Eine Erweiterung der Methode um die Option der absoluten Quantifizierung wäre denkbar. Hierfür müsste murine mtDNA kloniert werden und diese in einer Verdünnungsreihe mit definierten Kopienanzahlen in der realtime PCR parallel zu den Proben gemessen werden. Auf diese Weise könnten Ct-Werten absolute Molekülzahlen zugeschrieben werden.

Des Weiteren muss bei der Anwendung der Methode bedacht werden, dass sie in erster Linie Auskunft über die mtDNA-Kopienanzahl und nicht zwangsläufig über die Anzahl der Mitochondrien geben. Zwar geht die Biogenese der mtDNA häufig mit der Proliferation von Mitochondrien vergesellschaftet, prinzipiell kann sie aber auch unabhängig ablaufen (*Shadel GS, 1997*).

5.3. Einzelzelluntersuchungen

Analog zu den Untersuchungen an Gewebehomogenaten wurden entsprechende Experimente auch mit der DNA aus Einzelzellen durchgeführt. Hierbei wurde der Fokus auf dopaminerge Neurone der SN gelegt, um eine eventuelle Gewebespezifität im Sinne einer erhöhten Vulnerabilität auszumachen.

5.3.1. Tyrosinhydroxylase-Färbung

Insgesamt hat sich die Färbung bewährt, selektiv dopaminerge Neurone der SN darzustellen. Die Methode nutzt die Darstellung des Schlüsselenzyms (TH) einer bestimmten biochemischen Syntheseleistung (Dopaminsynthese) der Zellen als spezifischen Marker. Eine weitere Charakterisierung der Zellen ist dabei nicht möglich. Für die vorliegende Arbeit wäre die Kombination mit anderen Markern wünschenswert: Die COX/SDH-Färbung markiert Zellen mit hohen, funktionell relevanten Deletionsgraden (*Bender A, 2006*). Mittels 8OHdG-Färbung können durch oxidativen Stress geschädigte Zellen identifiziert werden.

Allerdings ist der Preis dieser Färbungen, dass die dopaminergen Neurone der SN nicht mehr sicher identifiziert werden können und dementsprechend auch nicht die Frage der besonderen Vulnerabilität dieser speziellen Neuronenpopulation beantwortet werden kann.

5.3.2. Ergebnisse der Deletionsuntersuchungen mittels realtime PCR

Faktoren, die die besondere Vulnerabilität der SN-Neurone bedingen, wurden bereits unter 1.1. ausführlich dargestellt.

Dennoch zeigten sich weder in der Gruppe der Neugeborenen noch in der Gruppe der älteren Tiere signifikante Unterschiede hinsichtlich der Deletionsbelastung in Abhängigkeit des Genotyps.

Andererseits wurde in anderen Arbeiten bei Mäusen mit partieller Defizienz der SOD2 eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber den mitochondrialen Toxinen Malonat, 3-Nitropropionsäure (3-NP) und MPTP nachgewiesen. Dies äußerte sich durch erhöhte Anfälligkeit für Dopamin-Depletion nach MPTP-Gabe und durch den Nachweis von signifikant ausgedehnteren striatalen Läsionen nach 3-NP- bzw. Malonat-Gabe im Vergleich zu Mäusen mit voller SOD2-Aktivität. Zudem konnten erhöhte ROS-Konzentrationen nachgewiesen werden, die mutmaßlich an der MPTP-, 3-NP- bzw. Malonat-vermittelten Neurotoxizität beteiligt sind (*Andreassen OA, 2001*).

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale $O_2^{\bullet-}$ -Toxizität in SN-Neuronen nach MPTP-Gabe über das Fe-S-haltige Enzym Aconitase vermittelt wird. Die Gabe von MPTP ist ein etabliertes Modell für experimentellen PD. Die Behandlung der Mäuse bewirkte eine Inaktivierung der mitochondrialen Aconitase, die Akkumulation von Eisen und Dopamin-Depletion. Diese Effekte waren in SOD2-überexprimierenden Mäusen abgeschwächt, wohingegen es bei Mäusen mit partieller SOD2-Defizienz zur Exazerbation kam (*Liang LP, 2004a*).

Die Daten belegen, dass subklinische Defekte eines antioxidativen Schutzzyms gepaart mit exogenen Toxinen in selektiver Neurodegeneration münden können. Auf der anderen Seite ist „nur“ partielle SOD2-Defizienz (im Fall der älteren, heterozygoten Tiere) offenbar nicht ausreichend, einen messbaren Effekt hervorzurufen. Im Falle der neugeborenen Knock-Outs besteht der Verdacht, dass die Auswirkung der SOD2-Defizienz zwar fatal sind, jedoch die Überlebensspanne nicht ausreicht, um im relevanten Ausmaß Deletionen zu akkumulieren.

Alternativer Erklärungsansatz wäre die Vermutung, dass über die Inaktivierung der mitochondrialen Aconitase der Stoffwechsel der Mitochondrien so stark gehemmt wird, dass auch der oxidative Stress abnimmt, was einem protektiven Effekt gleich käme. Überraschenderweise war die Deletionsbelastung bei den Neugeborenen in beiden Gruppen höher als in den Gruppen der einjährigen Tiere. Allerdings muss hier die geringe Probenanzahl berücksichtigt werden, so dass das Ergebnis a priori fraglich ist.

6. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, inwieweit ein Kausalzusammenhang zwischen oxidativem Stress und Δ mtDNA besteht. Die Akkumulation von Δ mtDNA scheint eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen und im Rahmen des Alterungsprozesses zu spielen. Zudem ist bekannt, dass dabei der oxidative Stress zunimmt. Während eine Korrelation der einzelnen Phänomene gut belegt ist, steht der Kausalitätsnachweis noch aus.

Die Arbeit ist vor dem Hintergrund der Mitochondrialen Theorie des Alterns entstanden.

Zur Klärung der Frage, ob oxidativer Stress tatsächlich ein Risikofaktor für die Entstehung von Δ mtDNA darstellt, wurde das SOD2-KO-Modell als Untersuchungsobjekt ausgewählt, das durch ein hohes Maß an endogenem oxidativen Stress speziell in den Mitochondrien gekennzeichnet ist. Folglich sind die mtDNA-Moleküle auch gegenüber erhöhten ROS-Konzentrationen exponiert.

Bei neugeborenen hetero- und homozygoten SOD2-KO-Mäusen waren im Herzmuskel, aber nicht im Gehirn, höhere Δ mtDNA-Belastungen als bei Wildtypen nachweisbar. Dieser Unterschied zwischen den Genotypen zeigte sich nach einem Jahr nicht mehr. Die zeitliche Dynamik der Deletionsbelastung konnte bei den einjährigen Wildtyp-Mäusen bestätigt werden. Sowohl im Herz als auch im Gehirn konnte ein Anstieg der Δ mtDNA-Belastung gemessen werden. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu Beobachtungen am Menschen, so dass die Maus prinzipiell als Modell für humane molekulare, mitochondriale Alterungsprozesse geeignet erscheint.

Nachdem Neurone der SN, deren progressiver Verlust wesentlich an der Pathogenese des PD beteiligt ist, eine besondere Suszeptibilität für die Akkumulation von Δ mtDNA aufweisen, erfolgten entsprechende Untersuchungen auch auf Einzelzellebene an dopaminergen SN-Neuronen. Hier waren weder in der Gruppe der Neugeborenen noch in der Gruppe der einjährigen Tiere signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Genotypen nachweisbar. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur relativen Kopienanzahl durchgeführt. Hier zeigte sich in der Gruppe der einjährigen Tiere bei den Heterozygoten eine hochsignifikante Erhöhung der relativen Kopienanzahl selektiv im Herzhomogenat. Dies wurde als reaktive Veränderung auf den erhöhten oxidativen Stress gewertet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass erhöhter oxidativer Stress initial durch Deletionsakkumulation in utero mit erhöhten Deletionsgraden einhergeht. Allerdings existieren offenbar effektive Kompensationsmechanismen, so dass die biologische Relevanz der Deletionen unklar bleibt und anhand der erhobenen experimentellen Daten nicht abschließend beurteilt werden kann. Die Ergebnisse weisen auf die Komplexität des SOD2-Mausmodells hin. Zum einen existieren genetische Modifikatoren der SOD2. Zum anderen ist die SOD2-Funktion offenbar viel differenzierter und komplexer als anfangs angenommen. Darüber hinaus stößt das SOD2-Mausmodell an eine der Grenzen der Mitochondrialen Theorie des Alterns: Die Lebensspanne der SOD2+/-Mäuse ist nicht vermindert.

Die Mitochondriale Theorie des Alterns wurde in den vergangenen Dekaden über verschiedene Ansätze extensiv überprüft. Eine weitere Fortentwicklung und Modifikation erscheint notwendig.

Die vorliegende Arbeit konnte die mitochondriale Theorie des Alterns weder bestätigen noch entkräften. Vielmehr gewährt sie Einblicke in die Komplexität der Thematik und belegt, dass die Kausalzusammenhänge weniger stringent sind, als bisher angenommen.

7. Literaturverzeichnis

- Ahting U, Floss T, Uez N. Neurological phenotype and reduced life-span in heterozygous Tim23 knockout mice, the first mouse model of defective mitochondrial import. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008 Dec 9 [Epub ahead of print]
- Alexeyev MF, Ledoux SP, Wilson GL. Mitochondrial DNA and aging. *Clin. Sci*. 107 (4), 355-364 (2004)
- Ali SS, Hardt JI, Qick KL, Kim-Han JS, Erlanger BF et al. A biologically effective fullerene (C60) derivative with superoxide dismutase properties. *Free Rad. Biol. Med.* 37, 1191-1202 (2004)
- Allen RG. Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 196 (2), 117-129 (1991)
- Andersen JK., Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Med.* 10 Suppl: S18-25, (2004)
- Andreassen OA, Ferrante JR, Dedeoglu A. Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-Nitropropionic Acid, and MPTP. *Exp. Neurol.* 167, 189-195 (2001)
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Biochem.* 70 (2), 200-214 (2005)
- Asikainen TM, Raivio KO, Saksela M, Kinnula VL. Expression and developmental profile of antioxidant enzymes in human lung and liver. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 19, 942-949 (1998)
- Balaban RS, Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120 (4), 483-95 (2005)
- Baron M, Kudin AP, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Biochem. Soc. Transac.* 35 (5), 1228-1231 (2007)
- Barrientos A, Casademont J, Cardellach F et al. Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial encoded genes in the human aging process. *Biochem. Mol. Med.* 62, 165-171 (1997b)
- Barrientos A, Casademont J, Cardellach F et al. Reduced steady-state levels of mitochondrial RNA and increased mitochondrial DNA amount in human brain with aging. *Mol. Brain Res.* 52, 284-289 (1997a)
- Bender A, Schwarzkopf RM, McMillan A et al. Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions. *J. Neurol.* 255 (8), 1231-1235 (2008)
- Bender A., Krishnan KJ., Morris CM., et al. High levels of mitochondrial DANN deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet.* 38 (5), 515-7, (2006)
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. Spektrum-Akademischer Verlag (2007)
- Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. *J Biol. Chem.* 267 (13), 8834-8839 (1992)
- Berneburg M, Kamenisch Y, Krutman J et al. „To repair or not to repair – no longer a question“: repair of mitochondrial DANN shielding against age and cancer. *Exp. Dermatol.* 15, 1005-1015 (2006)
- Biswas G, Adebajo OA, Freed,am BD et al. Retrograde Ca^{2+} signaling in C2C12 skeletal muscle myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: A novel model of inter-organelle crosstalk. *EMBO Journal* 18, 522-533 (1999)
- Biswas G, Anadatheerthavarada HK, Zaidi M, Avadhani NG. Mitochondria to nucleus stress signaling: A distinctive mechanism of NF κ B/Rel activation through calcineurin-mediated inactivation of I κ B β . *J Cell Biol.* 161, 507-519 (2003)

- Bladier C, Wolvetang EJ, Hutchinson P, de Haan JB, Kola I. Response of a primary human fibroblast cell line to H₂O₂: Senescence-like growth arrest or apoptosis. *Cell Gr. Diff.* 8, 589-598 (1997)
- Blankenship RE, Hartmann H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 23, 94-97 (1998)
- Boelsterli U.A., Hsiao, C.-J.J. The heterozygous SOD2^{+/-} mouse: modeling the mitochondrial role in drug toxicity. *Drug Discov Today* 1-7 (2008)
- Bogenhagen D & Clayton DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* 11, 719-727 (1976)
- Bohm C, Newrzella D, Sorgenfrei O. Laser microdissection in CNS research. *Drug Discovery Today* 10 (17), 1167-1174 (2005)
- Bohr VA, Stevnsner T, de Souza-Pinto NC. Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* 286, 127-134 (2002)
- Bonawitz ND, Shadel GS. Rethinking the Mitochondrial Theory of Aging. *Cell Cycle* 6 (13), 1574-1578 (2007)
- Boulet L, Karpati G, Shoubbridge EA. Distribution and threshold expression of the tRNA (Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and red-ragged fibers (MERRF). *Am. J. Hum. Genet.* 51 (6), 1187-1200 (1992)
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 1440-1450 (2002)
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1967-1971 (1979)
- Brzezinski P, Gennis RB. Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (5), 521-531 (2008)
- Bua E, Johnson J, Herbst A et al. Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am. J. Hum. Gen.* 79, 469-480 (2006)
- Bullerwell CE, Gray MW. Evolution of the mitochondrial genome: protists connections to animals, fungi and plants. *Curr. Opin. Microbiol.* 7 (5), 528-534 (2004)
- Carbone GM, St. Claire DK, Xu Y, Rose JC. Expression of manganese superoxide dismutase in ovine kidney cortex during development. *Pediatr. Res.* 35, 41-44 (1994)
- Carlsson LM, Jonsson J, Edlund T, Marklund SL. Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6264-6268 (1995)
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroxyperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 (39), 527-605 (1979)
- Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 107, 2169-2179 (1988)
- Chavko, M., Auker C. R., McCarron R. M. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide* 9, 18-23 (2003)
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S et al. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027-36031 (2003)
- Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J et al. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts. *Biochem J* 332, 43-50 (1998)
- Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM et al. Epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.* 48, 188-193 (2000)
- Chomyn A, Martinuzzi A, Yoneda M et al. MELAS mutation in mtDNA binding site of transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no changes in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (10), 4221-4225 (1992)

- Chung DJ, Wright AE, Clerch LB. The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry* 37, 16298-16306 (1998)
- Church SL, Grant JW, Meese EU, Trent JM. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. *Genomics* 14, 823-825 (1992)
- Ciechanover A.; Brundin P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometime the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-446 (2003)
- Clerch LB, Massaro D. Rat lung antioxidant enzymes: differences in perinatal gene expression and regulation. *Am. J. Physiol.* 263, L466-L470 (1992)
- Cohen G, Kesler N. Monoamine oxidase and mitochondrial respiration. *J. Neurochem.* 73, 2310-5 (1999)
- Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT et al. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet.* 2, 324-9 (1992)
- Cortopassi GA. Fixation of deleterious alleles, evolution and human aging. *Mech. Aging Dev.* 123, 851-855 (2002)
- Crapo JD, Oury T, Rabouille C et al. Cooper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10405-10409 (1992)
- Creagan R, Tischfield J, Ricciuti F, Ruddle FH. Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. *Humangenetik* 20, 203-209 (1973)
- Crimi M, Rigolio R. The mitochondrial genome, a growing interest inside an organelle. *Int. J. Nanomed.* 3 (1), 51-57 (2008)
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R et al. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 167-176 (2003)
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623 (2006)
- Das KC, Guo XL, White CW. Protein Kinase C delta-dependent induction of manganese superoxide dismutase gene by microtubule-active anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* 273, 34639-34645 (1998)
- Davis AF, Ropp PA, Clayton DA, Copeland WC. Mitochondrial DNA polymerase gamma is expressed and translated in the absence of mitochondrial maintenance and replication. *Nucl. Ac. Res.* 24, 2753-2759 (1996)
- DeRijk MC et al. Prevalence of Parkinson's disease in Europe : a collaborative study of population-based cohorts. Neurological Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, 21-23 (2000)
- DeSouza- Pinto NC, Mason PA, Hashiquichi K et al. Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria. *DNA Repair (Amst.)* 2009 Mar 7. [Epub ahead of print]
- DeSouza-Pinto N, Hogue B, Bohr VA. Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Res.* 61, 5378-5381 (2001)
- Diaz F, Bayona-Bafaluy MP, Rana M et al. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucl. Ac. Res.* 30, 4626-4633 (2002)
- DiMauro S, Tanji K, Bonilla E. Mitochondrial abnormalities in muscle and other aging cells: classification, causes, and effects. *Muscle Nerv* 26, 597-607 (2002)
- DiSilvestre D, Kleeberger SR, Johns J, Levitt RC. Structure and DNA sequence of the mouse MnSOD gen. *Mamm. Genome* 6, 281-284 (1995)

- Dougall WC, Nick HS. Manganese superoxide dismutase : a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. *Endocrinology* 129, 2376-2384 (1991)
- Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in live-history evolution. *Proc. Biol. Sci.* 2009 Feb 25 [Epub ahead of print]
- Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D et al. Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1325-1330 (2007)
- Elliott HR, Samuels DC, Eden JA et al. Pathogenetic mtDNA mutations are common in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 254-260 (2008)
- Elson JL, Samuels DC, Turnbull DM, Chinnery PF. Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 802-806 (2001)
- Evans DA et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *JAMA* 262, 2551-2556 (1989)
- Evans MJ & Scarpulla RC. NRF-1: A trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Gen. Develop.* 4, 1023-1034 (1990)
- Farin FM, Hitois Y, Hallagan SE et al. Genetic polymorphisms of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 16, 705-707 (2001)
- Fasano M, Bergamasco B, Lopiano L. Modifications of the iron-neuromelanin system in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 96, 909-916 (2006)
- Fenton HJH. *J. Chem. Soc. Proc.* 10, 157 (1894)
- Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutat. Res.* 614, 24-36 (2007)
- Forman J.H., Kennedy J. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 219-224 (1976)
- Forman J.H., Kennedy J. *J. Biol. Chem.* 250, 4322-4326 (1975)
- Forno LS. Pathology of Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S, eds. *Neurology*, 2: Movement Disorders. London: Butterworth Scientific 41-58 (1981)
- Frank L. Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* 11 (4), 341-348 (1991)
- Friedmann JS, Lopez MF, Fleming MD et al. SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness. *Blood* 104, 2565-2573 (2004)
- Friedmann JS, Rebel VI, Derby B et al. Absence in mitochondrial superoxide dismutase results in a murine hemolytic anemia responsive to therapy with a catalytic antioxidant. *J. Exp. Med.* 193, 925-934 (2001)
- Fukui H, Moraes CT. Mechanisms of formation and accumulation of mitochondrial DNA deletions in aging neurons. *Hum. Mol. Gen.* 18 (6), 1028-1036 (2009)
- Gadaleta MN, Rainaldi G, Lezza AM, Millela F et al. Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletions in adult and senescent rats. *Mut. Res.* 275, 181-193 (1992)
- Giulivi C, Boveris A, Cadenas E. Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine. *Arch. Biochem. Biophys.* 316, 909-916
- Golden TR, Hubbard A, Morten K, Hinerfeld D, Melov S. Pharmacogenomic profiling of an oxidative stress-mediated spongiform encephalopathy. *Free Rad. Biol. Med.* 39, 152-163 (2005)
- Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481 (1999)
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629 (2004)
- Halliwell B & Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* (3rd ed.). Oxford University Press. (1999)
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634-1658 (2006a)

- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn, Oxford University Press, Oxford (2006b)
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 20, 145-147 (1972)
- Harmann D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300 (1956)
- Harmann D. Free radical theory of ageing. *Triangle* 12, 153-158 (1973)
- Harmann D. Free radical theory of aging: consequences of mitochondrial aging. *Age* 6, 86-89 (1983)
- Harris CA, Derbin KS, Hunte-McDonough B et al. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. *J. Immunol.* 147, 149-154 (1991)
- Hauptmann N., Grimsby J., Shih J. C. et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 335, 295-304 (1996)
- Hayashibe H, Asayama K, Dobashi K, Kato K. Prenatal development of antioxidant enzymes in rat lung, kidney, and heart: marked increase in immunoreactive superoxide dismutases, glutathione peroxidase, and catalase in the kidney. *Pediatr. Res.* 27, 472-475 (1990)
- He L, Chinnery PF, Durham et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e68 (2002)
- Hinerfeld D, Traini MD, Weinberger RP et al. Endogenous mitochondrial oxidative stress: neurodegeneration, proteomic analysis, specific respiratory chain defects and efficacious antioxidant therapy in superoxide dismutase 2 null mice. *J. Neurochem.* 88, 657-667 (2004)
- Hiona A & Leeuwenburg C. The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp. Gerontol.* 43 (1), 24-33 (2008)
- Hiroi S, Harada H, Nishi H et al. Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 332-339 (1999)
- Huang J, Agus DB, Winfree CJ et al. Dehydroascorbic acid a blood-brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (11), 720-724 (2001)
- Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM et al. Genetic modification of prenatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11, 376-381 (2001)
- Huang TT, Naeemuddin M, Elchuri S et al. Genetic modifiers of the phenotype of mice deficient in mitochondrial superoxide dismutase. *Hum. Mol. Gen.* 15 (7), 2006
- Huang TT, Yasunami M, Carlson EJ et al. The use of transgenic and mutant mice to study oxygen free radical metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 893, 95-112 (1999)
- Huang Y, He T, Domann FE. Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell Biol.* 18, 643- 652 (1999)
- Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5'CpG island. *Free Radic. Biol. Med.* 23, 314-320 (1997)
- Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL et al. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain.* 131, 329-337 (2008)
- Ikegami T. et al. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 729-736 (2002)
- Imai H & Nakagawa Y. Biological significance GPx4 in mammalian cells. *Free Rad. Biol. Med.* 34, 145-169 (2003)
- Jezek P, Hlavata L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 37, 2478-2503 (2005)

- Jones PL, Kucera G, Gordon H, Boss JM. Cloning and characterization of the murine manganese superoxide dismutase encoding gene. *Gene* 153, 155-161 (1995)
- Jones PL, Ping D, Boss JM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6970-6981 (1997)
- Keller GA, Warner TG, Steimer KS, Hallewell RA. Cu,Zn superoxide dismutase is a peroxisomal enzyme in human fibroblasts and hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7381-7385 (1991)
- Kim HP, Roe JH, Chock PB, Yim MB. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J. Biol. Chem.* 274, 37455-37460 (1999)
- Knirsch L, Clerch LB. A region in the 3' UTR of MnSOD RNA enhances translation of a heterologous RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 164-168 (2000)
- Knirsch L, Clerch LB. Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry* 40, 7890-7895 (2001)
- Koehler CM. New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Devel. Biol.* 20, 309-335 (2004)
- Kokoszka JE, Coskun P, Esposito LA, Wallace DC. Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod^{+/-} mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2278-2283 (2001)
- Kratysberg Y., Kudryavtseva E., McKee AC., et al. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat. Genet.* 38 (5), 507-8 (2006)
- Krishnan KJ, Bender A, Taylor RW, Turnbull DM. A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Anal. Biochem.* 370, 127-129 (2007a)
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Gen.* 40 (3), 275-279 (2008)
- Krishnan KJ, Reeve AK, Turnbull DM. Do mitochondrial DNA mutations have a role in neurodegenerative disease? *Biochem. Soc. Vol. 35 part 5*, 1232-1235 (2007b)
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann. Rev. Physiol.* 60, 619-642 (1998)
- Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309, 481-484 (2005)
- Kukull WA, Bowen JD. Dementia epidemiology. *Med. Clin. North Am.* 86, 573-590 (2002)
- Kuo S, Chesrown SE, Mellott JK et al. In vivo architecture of the manganese superoxide dismutase promoter. *J. Biol. Chem.* 274, 3345-3354 (1999)
- Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.* 368, 545-553 (2002)
- Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing Dev.* 126 (8), 907-908 (2005)
- Lapidus RG, Sokolove PM. The mitochondrial permeability transition. Interaction of spermine, ADP, and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 269 (22), 18931-18936 (1994)
- Larsson NG, Wang JM, Wilhelmsson H et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Gen.* 18, 231-236 (1998)
- Lebovitz RM., Zhang H., Vogel H., et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 9782-7 (1996)

- Lee CM, Lopez ME, Weindruch R, Aiken JM. Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy. *Free. Rad. Biol. Med.* 25, 964-972 (1998)
- Lee HC & Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *Journal of Biomedical Science* 7, 2-15 (2000a)
- Lee HC & Wei YH. Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging. *Exp. Biol. Med.* 232, 592-606 (2007)
- Lee HC, Lu CY, Fahn HJ, Wei YH. Aging- and smoking associated alteration in the relative content of mitochondrial DNA in human lung. *FEBS letters* 441, 292-296 (1998)
- Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cell under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 822-834 (2005)
- Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J. Biomed. Sci.* 9, 517-526 (2002)
- Lee HC, Yin PH, Lu CY et al. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.* 348, 425-432 (2000b)
- Lee YH, Boelsterli UA, Lin Q, Chung MCM. Proteomic profiling of hepatic mitochondria in heterozygous Sod2^{+/-} mice, an animal model of discrete mitochondrial oxidative stress. *Proteomics* 8, 555-568 (2008)
- Lee YH, Lin Q, Boelsterli UA, Chung MCM. The SOD2 mutant mouse as a model for oxidative stress: A functional proteomics perspective. 2009, Jan [Epub ahead of print]
- Li Y, Huang TT, Carlson S et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Gen.* 11, 376-381 (1995)
- Liang LP, Patel M. Iron-sulfur enzyme mediated mitochondrial superoxide toxicity in experimental Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 90, 1076-1084 (2004a)
- Liang LP, Patel M. Mitochondrial oxidative stress and increased seizures susceptibility in SOD2(+/-) mice. *Free Radic. Biol. Med.* 36 (5), 542-554 (2004b)
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443 (7113), 787-95 (2006)
- Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to aging and degenerative disease. *Lancet* i, 642-643 (1989)
- Liou W, Chang LY, Geuze HJ. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 201-207 (1993)
- Liu X, Kim CN, Yang J et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157 (1996)
- Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 545-550 (2001)
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2006)
- Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA et al. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 364, 875-882 (2004)
- Lynn S, EJ Huang, Elchuri S et al. Selective neuronal vulnerability and inadequate stress response in superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 817-828 (2005)
- Mambo E, Gao X, Cohen Y. Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 1838-1843 (2003)
- Manfredi G. MtDNA clock runs out for dopaminergic neurons. *Nat. Genet.* 38 (5), 507-508, (2006)
- Mao H, Schnetz-Boutaud NC, Weisenseel JP et al. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proc. Natl. Sci. USA* 96, 6615-6620 (1999)

- Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 45, 847-851 (1986)
- Marklund SL, Holme E, Hellner L. Superoxide dismutase in extracellular fluids *Clin. Chim. Acta* 126, 41-51 (1982)
- Masuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appela E et al. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *FASEB J.* 2, 3087-3091 (1988)
- Meissner C, Bruse P, Oehmichen M. Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age. *Exp. Gerontol.* 41, 518-524 (2006)
- Melov S, Doctrow SR, Schneider JA et al. Lifespan extension and rescue of spongiform encephalopathy in superoxide dismutase 2 nullizygous mice treated with superoxide dismutase-catalase mimetics. *J. Neurosci.* 21 (21), 8348-8353 (2001)
- Melov S, Hinerfeld D, Esposito L, Wallace DC. Multi-organ characterization of mitochondrial genomic rearrangements in ad libitum and caloric restricted mice show striking somatic mitochondrial DNA rearrangements with age. *Nucl. Ac. Res.* 25, 974-982 (1997)
- Melov S., Coskun P., Patel M., et al. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice 96, 846-51 (1999)
- Melov S., Schneider JA, Day D. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.* 18, 159-163 (1998)
- Mertens G. Evolution, health and disease – Darwinian approaches to medicine. *Acta. Clin. Belg.* 64 (1), 2-6 (2009)
- Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* 15, 575-591 (1980)
- Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in different cells. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 12, 99-117 (1991)
- Mitrunen K, Sillanpää P, Kataja V et al. Association between manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene polymorphism and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 22, 827-829 (2001)
- Miwa S., St-Pierre J., Partridge L. et al. *Free Rad. Biol. Med.*, 35, 938-948 (2003)
- Miyako K, Kai Y, Irie T et al. The content of intracellular mtDNA is decreased by MPP⁺. *J. Biol. Chem.* 272, 9605-9608 (1997)
- Moraes CT. What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? *Trend in Genetics* 17, 199-205 (2001)
- Moran NA. Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2873-2878 (1996)
- Müller-Höcker J. Cytochrome c oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart – an age-related phenomenon: a histochemical ultracytochemical study. *Am. J. Pathol.* 134, 1167-1173 (1989)
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1-13 (2009)
- Muscoli C., Cuzzocrea S., Riley DP., et al. On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. *Br. J. Pharmacol.* 140, 445-60 (2003)
- Nakada K, Sato A, Hayashi JJ. Reverse genetic studies of mitochondrial DNA-based diseases using a mouse model. *Proc. Jpn. Acad., Ser B* 84 (2008)
- Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J et al. Individual dopaminergic neurons showed raised iron levels in Parkinson disease. *Neurol.* 68, 1820-1825 (2007)
- Ong MM, Latchoumycandane C, Boelsterli UA. Troglitazone-induces hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities. *Toxicol. Sci.* 97 (1), 205-213 (2007)
- Ong MM, Wang AS, Leow KY et al. Nimesulide-induced hepatic mitochondrial injury in heterozygous SOD2(+/-) mice. *Free Rad. Biol. Med.* 40 (3), 420-429 (2006)

- Parboosingh JS, Rouleau GA, Meninger V et al. Absence of mutations in the Mn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuromuscul. Disord.* 5, 7-10 (1995)
- Parks E & Traber MG. Mechanisms of vitamin E regulation: research over the past decade and focus on the future. *Antioxid. Redox Signal* 2, 405-412 (2000)
- Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P et al. Ascorbic treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Med.* 10, 396-401 (2004)
- Perez-Campo R, Lopez-Torres M, Cadenas S, et al. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp Physiol [B]* 168 (3), 149-158 (1998)
- Pesce V, Cormio A, Fracasso et al. Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Rad. Biol. Med.* 30, 1223-1233 (2001)
- Petronilli V, Costanini P, Scorrano L et al. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of the vicinal thiols. *J Biol. Chem.* 269 (24), 16638-16642 (1994)
- Pfanner N. Protein sorting: Recognizing mitochondrial presequences. *Curr. Biol.* 10 R412-415 (2000)
- Pohlschroeder M, Dilks K, Hand NJ et al. Translocation of proteins across aracheal cytoplasmic membranes. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 3-24 (2003)
- Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. *Cell biology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2007)
- Poyton RO & McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 563-607 (1996)
- Puigserver P & Spiegelmann BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC1-alpha): Transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrin reviews* 24, 78-90 (2003)
- Qi X, Lewis AS, Hauswirth WW, Guy J. Optic neuropathy induced by reductions in mitochondrial superoxide dismutase. *Invest. Ophth. Vis. Sc.* 44, 1088-1096 (2003)
- Quijano C, Hernandez-Saavedra D, Castro L et al. Reaction of peroxynitrite with Mn-Superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J. Biol. Chem.* 276, 11631-11638 (2001)
- Reaume AG, Elliott JL, Hoffmann EK et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxides dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13 (1), 43-47 (1996)
- Reeve AK, Krishnan KJ, Morris CM et al. Mitochondrial DNA deletions in Substantia Nigra neurons. *Am. J. Hum. Gen.* 82, 228-235 (2008b)
- Reeve AK, Krishnan KJ, Turnbull D. Mitochondrial mutations in disease, aging and neurodegeneration. *Ann. N. Y. Sci.* 1147, 21-29 (2008a)
- Renis M, Cantatore P, Loguerico P et al. Content of mtDNA and of three mitochondrial RNAs in developing and adult cerebellum. *J. Neurochem.* 52, 750-754 (1989)
- Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trend Neurosci.* 23, 209-216 (2000)
- Rodriguez-Trelles F, Tarrio R, Ayala FJ. Erratic overdispersion of three molecular clocks: GPDH, SOD, and XDH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11405-11410 (2001)
- Rolseth V, Runden-Pran E, Luna L et al. Widespread distribution of DNA glycosylase removing oxidative DNA lesions in human and rodent brains. *DNA Repair* 7 (9), 1578-1588 (2008)
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59-62 (1993)
- Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4471-4473 (1996)

- Samper E, Nicholls DG, Melov S. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 2, 277-285 (2003)
- Schaefer AM, McFarland R, Blakely L et al. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann. Neurol.* 63, 35-39 (2008)
- Scheffler IE. *Mitochondria*. New York, Wiley & Sons (1999)
- Schenck JF, Zimmermann EA. High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed.* 17 (7), 433-445 (2004)
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308 (5730), 1909-11 (2005)
- Schultz RA, Swoap SJ, McDaniel LD et al. Differential expression of mitochondrial DNA replication factors in mammalian tissues. *J. Biol. Chem.* 273, 3447-3451 (1998)
- Sciaccò M, Bonilla E, Schon EA et al. Distribution of wild-type and common-deletion forms of mtDNA in normal and respiration-deficient muscle fibers from patients with mitochondrial myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 3, 13-19 (1994)
- Shadel GS & Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 409-435 (1997)
- Shay JW, Pierce DJ, Werbin H. Mitochondrial DNA copy number is proportional to total cell DNA under a variety of growth conditions. *J. Biol. Chem.* 265, 14802-14807 (1990)
- Shelton MD, Mieyal JJ. Regulation by reversible S-glutathionylation: molecular targets implicated in inflammatory diseases. *Mol. Cells* 25 (3), 332-346 (2008)
- Shmookler RJ & Goldstein S. Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. *J. Biol. Chem.* 258, 9078-9085 (1983)
- Siems WG, Grune T, Esterbauer H. 4-Hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Sci.* 57, 785-789 (1995)
- Sotiriou S, Gispert S, Cheng J et al. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat. Med.* 8 (5), 514-517 (2002)
- Spencer JP, Jenner P, Daniel SE et al. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 71 (5), 2112-2122 (1998)
- St. Clair DK, Oberley TD, Muse KE, St. Clair WH. Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation. *Free Rad. Biol. Med.* 16, 275-282 (1994)
- Stadtman ER. Role of oxidants species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11, 1105-1112 (2004)
- Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1147, 37-52 (2008)
- Stewart JB, Freyer C, Elson JL, Larsson NG. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 657-662 (2008)
- Strassburger M. et al. Heterozygous deficiency of manganese superoxide dismutase results in severe lipid peroxidation and spontaneous apoptosis in murine myocardium in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1458-1470 (2005)
- Suliman HB, Carraway MS, Welty-Wolf et al. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis via activation of nuclear respiratory factor-1. *J. Biol. Chem.* 278, 41510-41518 (2003)
- Suzuki H, Kumagai T, Goto A, Sugiura T. Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells *J. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 249, 542-545 (1998)
- Tomblyn M, Kasarskis EJ, Xu Y, St. Clair DK. Distribution of MnSOD polymorphisms in sporadic ALS patients. *J. Mol. Neurosci.* 10, 65-66 (1998)
- Tomkins J, Banner SJ, McDermott CJ, Shaw PJ. Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 12, 2319-2322 (2001)
- Tretter L., Adam-Vizi V. *J. Neurosci.*, 24, 7771-7778 (2004)

- Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A et al. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotype without affecting reactive oxygen species production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (52), 18769-18770 (2005)
- Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of aging. *J Intern Med* 263, 153-166 (2008)
- Trifunovic A., Wredenberg A., Falkenberg M., et al Premature aging in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-23 (2004)
- Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex 3 of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237, 408-414 (1985)
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44-84 (2007)
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40 (2006)
- Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Beckman G et al. Manganese-containing superoxide dismutase signal sequence polymorphism associated with sporadic motor neuron disease. *Eur. J. Neurol.* 6, 639-644 (1999)
- Van Remmen H, Qi W, Sabia M et al. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 36 (12), 1625-1634 (2004)
- Van Remmen H, Salvador C, Yang H et al. Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 91-97 (1999)
- Van Remmen H, Williams MD, Guo Z et al. Knockout mice heterozygous for Sod2 show alterations in cardiac mitochondrial function and apoptosis. *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* 281, H1422-H1432 (2001)
- Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., et al., Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* 16, 29-37 (2003)
- Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B., Kennedy M.C., *J. Biol. Chem.*, 275, 14064-14069 (2000)
- Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC et al. DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nature Genetics* 392-394 (2008)
- Virbasius JV & Scarpulla RC. Activation of the human mtTFA gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA* 91, 1309-1313 (1994)
- Visner GA, Chesrown SE, Monnier J et al. Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 188, 453-462 (1992a)
- Visner GA, Dougall WC, Wilson JM et al. Regulation of superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 265, 2856-2864 (1992b)
- Vlissis AA, Mela-Riker L. Perinatal development of heart, kidney, and liver mitochondrial antioxidant defense. *Pediatr. Res.* 26, 220-225 (1989)
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488 (1999)
- Wan XS, Devalaraja MN, St. Clair DK. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 13, 1127-1136 (1994)
- Wanagat J, Cao Z, Pathare P, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalized with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J.* 15 (2), 322-332 (2001)
- Wang E, Wong A, Cortopassi G. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than in humans. *Mutat. Res.* 377, 157-166 (1997)

- Wang GJ, Nutter LM, Thayer SA. Insensitivity of cultured rat cortical neurons to mitochondrial DNA synthesis inhibitors: evidence for a slow turnover of mitochondrial DNA. *Biochem. Pharmacol.* 54, 181-187 (1997)
- Wang J, Silva JP, Gustafsson CM et al. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4038-4043 (2001)
- Wei YH & Lee HC. Mitochondrial DNA mutations and oxidative stress in mitochondrial diseases. *Exp. Biol. Med.* 227, 671-682 (2003)
- Wei YH & Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med.* 227, 671-682 (2002)
- Wei YH. Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat. Res.* 275, 145-155 (1992)
- Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248, 4793-4796 (1973)
- Wenz T, Diaz F, Spiegelmann BM, Moraes CT. Activation of the PPAR/PGC-1 α pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell Metab.* 8, 249-256 (2008)
- Whatley S. A., Curti D., Das Gupta F. et al. *Mol. Psychiatry*, 3, 227-237 (1998)
- Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R. Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocr.* 6, 1458-1467 (1992)
- Williams MD, Van Remmen H, Conrad CC et al. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese dismutase knockout mice. *J. Biol. Chem.* 273, 28510-28515 (1998)
- Williams RS, Salmons S, Newsholme EA et al. Regulation of nuclear and mitochondrial gene expression by contractile activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 261, 376-380 (1986)
- Wispe JR, Warner BB, Clark JC et al. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J. Biol. Chem.* 267, 23937-23941 (1992)
- Wong GH Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242, 941-944 (1988)
- Xia XG, Zhou H, Samper E et al. Pol 2-expressed shRNA knocks down Sod2 gene expression and causes phenotype of the gene knockout in mice. *PloS Genet.* 2, 73-80 (2006)
- Yamakura F, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of 34 to 3-Nitrotyrosine. *J. Biol. Chem.* 273, 14085-14089 (1998)
- Yang JL, Weissmann L, Bohr V, Mattson MP. Mitochondrial DNA Damage and Repair in Neurodegenerative Disorders. *DNA Repair* 7(7), 1110-1120 (2008)
- Yeh CC, Wan XS, St. Clair DK. Transcriptional regulation of the 5' proximal promoter of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* 17, 921-930 (1998)
- Youngmok CJ, Van Remmen H. The mitochondrial theory of aging: Insight from transgenic and knockout mouse models. *Exp. Geront.* 44, 256-260 (2009)
- Yuan HT, Bingle CD, Kelly FJ. Differential patterns of antioxidant enzyme mRNA expression in guinea pig lung and liver during development. *Biochim. Biophys. Acta* 1305, 163-171 (1996)
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family : A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337-349 (2002)
- Zhang HJ, Yan T, Oberley TD, Oberley LW. Comparison of two polymorphic variants of manganese superoxide dismutase on human breast MCF-7 cancer cell phenotype. *Cancer Res.* 59, 6276-6283 (1999)
- Zhang L., Yu L., Yu C. A.. *J. Biol. Chem.*, 273, 33972-33976 (1998)

- Zhang N. Characterization of the 5'-flanking region of the human MnSOD gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220, 171-180 (1996)
- Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J. Biol. Chem.* 276, 14407-14413 (2001)
- Zoratti M & Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 139-176

8. Abkürzungsverzeichnis

3-NP	3-Nitropropionsäure
3-NT	3-Nitrotyrosin
8-OHdG	8-Hydroxy-2-desoxyguanosin
8-OH-G	8-Hydroxy-Guanosin
ACTB	β-Aktin
AD	Alzheimers Disease
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptosis-initiating-factor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMP	Adenosinmonophosphat
ANT	Adosinnukleotidtranslokator
ATP	Adosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoQ	Coenzym Q
COX	Cytochrom-c Oxidase
COX3	Cytochrom-c Oxidase Untereinheit 4
Cp	Crossing-Point
Ct	Threshold Cycle
Cu/ZnSOD	Kupfer-/Zinkhaltige Superoxiddismutase, syn. SOD1
Cyt b	Cytochrom b
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	Reinstes Wasser
DHOC	Dihydroorotatdehydrogenase
DNA	Desoxynukleinsäure
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
EC-SOD3	Extrazelluläre Superoxiddismutase, syn. SOD3
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
ETC	Elektronentransportkette
fALS	Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
FDA	Friedreichs´ Ataxie
Fe-S-	Eisen-Schwefel-
FMN	Flavinmononukleotid
GPDH	α-Glycerophosphatdehydrogenase
Gpx-1	Glutathionperoxidase-1
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid (bestehend aus zwei oxidierten GSH-Molekülen)
GTPase	Guanintriphosphatase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser
HD	Huntingtons´ Disease
HNE	4-Hydroxy-2-Nonenal

kBp	Kilobasenpaare
KGDHC	α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplex
KO	Knock-Out
LMD	Lasermikrodissektion
m	Steigung der Standardkurve bei realtime PCR
MAO-A/-B	Monoaminoxidase A/B
MDA	Malondialdehyd
Mitom	Mitochondriales Genom
MMR	Missmatch-Reparatur, Basenfehlpaarungsreparatur
MnSOD	Manganhaltige Superoxiddismutase, syn. SOD2
MnTBAP	Mangan-Tetrakis-5,10,15,20-Benzoessäure-Porphyrin
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridin
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	Messenger RNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
mtPTP	mitochondriale Permeabilitätstransitions-pore
mtSSB	Mitochondriales Single-Strang-bindendes-Protein
mtTFA	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A; syn. TFAM
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
ND1	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 1
ND4	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 4
nDNA	Nukleäre DNA
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nt	Nukleotid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{-•}	Superoxidanion
OGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase
OH•	Hydroxylradikal
ONOO-	Peroxynitritradikal
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinsons' Disease
PGC-1 α	Peroxisomen-proliferationsaktivierter-Rezeptor- γ -Coaktivator-1 α
PNS	Peripheres Nervensystem
POLG	Polymerase gamma
Poly-HRP	Poly-Horse-Radish-Peroxidase
QTL	Quantitative Trait Locus
R ²	Effizienz der realtime PCR
RCR	Respiratory Control Ratio
RNA	Ribosomale Nukleinsäure
ROO•	Hydroxylradikal
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRF	Ragged Red Fibers
rRNA	Ribosomale RNA
RS	Reaktive Spezies
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compact

SOD	Superoxiddismutase
SOD1	Superoxiddismutase 1, syn. Cu/ZnSOD
SOD2	Superoxiddismutase 2, syn. MnSOD
SOD3	Superoxiddismutase 3, syn. EC-SOD3
TCA	Zitronensäurezyklus, Krebs' Zyklus
TFAM	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor A; syn. mtTFA
TH	Tyrosinhydroxylase
tRNA	transferRNA
ZNS	Zentrales Nervensystem
Δ Ct-Wert	Differenz zweier Ct-Werte einer Probe
Δ mtDNA	mtDNA-Deletionen
$\Delta\Delta$ Ct-Wert	Differenz zweier Δ Ct-Werte zweier Proben
$\Delta\Psi$	Elektrochemischer Gradient

9. Danksagungen

Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die engagierte Leitung des Promotionsstudiengangs „Molekulare Medizin“ im Rahmen der LMU Initiative „Förderung von Forschung und Lehre“ (FöFoLe).

PD Dr. med. Andreas Bender für die kontinuierliche und intensive Betreuung der Arbeit und die Übernahme als Doktorvater.

Prof. Dr. Th. Meitinger für die interessante Famulatur 2006 im Institut für Humangenetik und die ersten Einblicke in die Welt der Wissenschaft.

Dr. Lore Becker für die gute Zusammenarbeit.

Cornelia Grimm stellvertretend für die Damen des Friedrich-Baur-Instituts.

Meinen Eltern für die ideelle und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meinem Mann Johannes Weber für den starken Rückhalt und die glückliche Beziehung.

Meinem Fahrrad für die vielen Fahrten im Dienste der Wissenschaft.